丝状真菌分子细胞生物学与实验技术

编著　　林福呈　王洪凯

科学出版社
www.sciencep.com

(R-3477.0101)

科学出版社 医学出版中心
E-mail: med-edu@mail.sciencep.com
电话：010-64034601 64019259

ISBN 978-7-03-029010-6
9 787030 290106 >

定 价：49.00 元

丝状真菌分子细胞生物学与实验技术

编　　著　林福呈　王洪凯

编写人员　（按姓氏笔画排序）

王洪凯　卢建平　刘小红　刘同宝

武治印　林福呈　胡东淮　徐　飞

章初龙　阎章才

科学出版社

北　京

·版权所有　侵权必究·
举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

真菌是真核生物的重要研究模式,广泛应用于真核细胞生命活动机制的基础研究中。真菌也是生态系统中的重要组成部分,还是重要的生物资源,在医药、轻工、环保、食品、农业等领域应用广泛,开发前景广阔。本书在总结近年来真菌分子细胞生物学研究的最新成果基础上,着重介绍真菌分子细胞生物学研究中的常用技术,有针对性地提出了真菌分子细胞生物学研究的技术原理和方案。全书分为14章,主要内容包括:真菌基因型的鉴定与特征分析、核酸的分析、真菌遗传转化、功能基因组学、生化与免疫方法、分子系统学及生物信息学常用软件等。本书可以作为高等院校真菌学相关课程的教材,也可以作为高等院校和科研院所真菌研究者在分子细胞生物学研究方面的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

丝状真菌分子细胞生物学与实验技术 / 林福呈,王洪凯编著. —北京:科学出版社,2010.10

ISBN 978-7-03-029010-6

Ⅰ.丝… Ⅱ.①林… ②王… Ⅲ.丝状真菌:真菌-分子生物学:细胞生物学-研究 Ⅳ.Q949.32

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第182022号

策划编辑:吴茵杰 / 责任编辑:邱　波 / 责任校对:张怡君
责任印制:刘士平 / 封面设计:黄　超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717
http://www.sciencep.com
新蕾印刷厂印刷
科学出版社发行　各地新华书店经销
*
2010年10月第　一　版　开本:787×1092 1/16
2010年10月第一次印刷　印张:16 1/4
印数:1—2 000　字数:381 000
定价:49.00元
(如有印装质量问题,我社负责调换)

前　言

作为生态系统中的重要组成部分，真菌在物质循环和能量循环过程中都有重要的作用。虽然人类对真菌的应用历史悠久，但直到最近人们才认识到真菌是重要的生物资源，在医药、轻工、环保、食品、农业等领域应用广泛，开发前景非常广阔。真菌是真核生物，具有结构简单、生活史短、易于培养的特点，使真菌成为研究真核生物的重要研究模式。近年来，以真菌为研究对象，以克隆和分析基因功能为目的的研究进展非常迅速，极大地促进了真菌分子细胞生物学的发展，在阐明细胞周期的调控、顶端生长机制、细胞分化调节及真菌致病机制等生物学基本机制方面提供了很有意义的信息。

虽然许多真菌分子生物学的技术和原理与其他生物的分子生物学原理基本相同，但是，许多在动物和植物等其他真核生物上应用的方法技术，需要经过一定的调整才能在真菌生物学研究中顺利应用。因此，真菌细胞分子生物学研究技术还是面临许多挑战。于是编者在几年前便有了对应用于真菌分子细胞生物学技术与原理进行汇集整理的想法，为高校开展真菌学的教学和科研提供教材，同时也为从事真菌细胞分子生物学研究的科研工作者提供技术参考。

在国家自然科学基金委杰出青年基金、水稻生物学国家重点实验室的支持、资助下，本书得以顺利完成。编者在此表示感谢！同时，对关心、帮助过此书编写的专家、学者表示衷心感谢！

本书将丝状真菌研究领域中的分子细胞学研究技术进行了总结，根据不同研究目的提供了可能的研究方案。本书可以作为高等院校和科研机构的教材，也可以为环境、医药、生物资源、植物病理、微生物等领域的本科生、硕士和博士研究生及相关研究人员提供理论和实验技术指导。由于编者水平和条件的限制，不足之处在所难免，望多提宝贵建议。

编　者

2010 年 8 月

目　　录

前言

第一章　丝状真菌基因型特征的鉴定 …… (1)

1　概述 …… (1)

2　基因组变异的主要特征 …… (1)

3　确定研究目的 …… (2)

4　用于基因组分析的技术 …… (3)

5　假设 …… (8)

6　选择最佳策略 …… (9)

方案 1　链格孢真菌的 RAPD 分析 …… (11)

7　AFLP 技术的原理及其应用 …… (13)

方案 2　丝状真菌的 AFLP 分析 …… (16)

方案 3　丝状真菌的 cDNA-AFLP …… (19)

8　变性梯度凝胶电泳(DGGE) …… (21)

方案 4　土壤中真菌的 DGGE 分析 …… (22)

9　重要的数据库和互联网资源 …… (24)

第二章　丝状真菌核酸的提取与分析 …… (26)

1　概述 …… (26)

2　基因组 DNA 的分离 …… (26)

方案 1　CTAB 法提取真菌基因组 DNA …… (27)

方案 2　氯化苄(benzyl chloride)法提取真菌基因组 DNA …… (28)

方案 3　丝状真菌总 DNA 的分离 …… (29)

方案 4　固体平板上菌小量 DNA 的块速提取(以稻瘟病菌为例) …… (31)

方案 5　真菌小量 DNA 的快速提取 …… (31)

3　丝状真菌 RNA 的提取 …… (32)

4　RNA 的操作 …… (32)

方案 6　Trizol 法提取丝状真菌总 RNA …… (33)

方案 7　丝状真菌总 RNA 的提取 …… (33)

方案 8　真菌总 RNA 的小量提取(Trizol 法) …… (34)

第三章　丝状真菌的 DNA 转化 …… (35)

1　概述 …… (35)

2　选择性标记和转化载体 …… (35)

3　待转化 DNA 的质量 …… (37)

4　DNA 的进入 …… (37)

5　REMI 转化 …… (38)

方案 1　稻瘟病菌(*Magna porthe grisea*)原生质体的制备及转化 …… (38)
方案 2　毛壳菌原生质体的制备 …… (39)
6　真菌 ATMT 转化 …… (40)
方案 3　感受态农杆菌细胞的制备与转化 …… (40)
方案 4　利用农杆菌转化真菌 …… (41)
7　电击转化 …… (42)
方案 5　Tapesia yallundae 的电击转化 …… (42)
8　转化 DNA 的命运 …… (42)
方案 6　丝状真菌中的质粒拯救 …… (43)
方案 7　农杆菌电击转化感受态的制备与转化 …… (45)
第四章　丝状真菌的遗传分析 …… (48)
1　子囊菌遗传分析 …… (48)
方案 1　对真菌孢子进行化学诱变 …… (49)
方案 2　对真菌的孢子进行紫外诱变 …… (50)
方案 3　营养缺陷型突变体的筛选与鉴定 …… (51)
方案 4　温度敏感型突变群体的制备 …… (51)
方案 5　单孢分离 …… (52)
方案 6　构巢曲霉的八分体分析 …… (53)
方案 7　通过准性重配确定里连锁群 …… (54)
方案 8　稻瘟病菌温度敏感型突变体的筛选 …… (55)
2　担子菌遗传分析 …… (56)
方案 9　鬼伞菌在人工培养条件子实体和担孢子的产生 …… (58)
方案 10　通过 CHEF 凝胶电泳分离 *C. cinereus* 的染色体 …… (62)
方案 11　*C. cinereus* 的四分体分离 …… (64)
方案 12　*C. cinereus* 粉孢子的紫外诱变 …… (65)
方案 13　利用 NTG(MNNG)/EMS 对担子菌进行诱变 …… (66)
方案 14　平板印迹 …… (68)
附:担子菌研究中的标准培养基 …… (69)
第五章　丝状真菌的基因组分析 …… (70)
1　概述 …… (70)
2　遗传图谱 …… (70)
方案 1　克隆固定大小的基因组 DNA 作为 RFLP 探针 …… (71)
方案 2　RAPD 操作要点 …… (71)
3　电泳核型分析 …… (73)
方案 3　琼脂糖栓中制备完整染色体 DNA …… (73)
方案 4　琼脂糖栓电泳 …… (73)
方案 5　钳位均匀电场电泳 …… (74)
4　物理图谱 …… (75)
方案 6　染色体 DNA 的 RecA-AC …… (75)

方案 7　准备 BAC 载体 DNA …… (78)
方案 8　准备 BAC 插入 DNA …… (78)
方案 9　BAC 插入 DNA 大小的选择,恢复和克隆 …… (79)
方案 10　将文库克隆排列到杂交膜上 …… (80)
方案 11　收集克隆文库 …… (80)
5　筛选文库 …… (81)
方案 12　Southern 杂交分析混合文库和克隆阵列文库 …… (81)
6　染色体步移(chromosome walking) …… (82)
方案 13　BAC 或者黏粒末端 RNA 探针的合成 …… (82)
方案 14　根据插入片段末端序列制备的探针 …… (83)
7　真菌基因组分析相关数字资源 …… (85)
第六章　真菌发育过程的细胞学分析 …… (86)
1　概述 …… (86)
2　丝状真菌生长的测定 …… (86)
方案 1　菌丝顶端生长的测定 …… (86)
方案 2　菌落生长速度的测定 …… (87)
方案 3　直线生长速率的测定 …… (87)
3　丝状真菌孢子的萌发 …… (87)
方案 4　真菌孢子的萌发测定 …… (87)
4　稻瘟病菌细胞生物学分析 …… (87)
方案 5　稻瘟病菌产孢培养、孢子收集和附着胞诱导培养 …… (88)
方案 6　稻瘟病菌侵染过程的组织病理学观察 …… (88)
方案 7　稻瘟病菌孢子、附着胞内脂质体、糖原的观察 …… (88)
方案 8　细胞自噬现象的观察 …… (89)
方案 9　酒精氧化酶活性测定 …… (89)
方案 10　冷冻替代用于电子显微镜观察 …… (90)
方案 11　细胞核,细胞壁和隔膜的染色 …… (90)
第七章　丝状真菌的信号传导 …… (92)
1　概述 …… (92)
2　蛋白抽提 …… (93)
方案 1　构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)蛋白激酶的抽提 …… (93)
3　蛋白免疫沉淀反应 …… (94)
方案 2　NIMA 在大肠埃希菌(*E. coli*)中的表达和 His-tag 亲和纯化 …… (94)
方案 3　蛋白质免疫沉淀(IP) …… (95)
4　凝胶阻滞试验(gel-shift assay)检测蛋白的磷酸化状态 …… (95)
方案 4　NIMA 磷酸化状态的凝胶阻滞试验 …… (96)

5 蛋白激酶的底物特异性分析 …… (96)
方案 5 NIMA 激酶分析 …… (97)
第八章 丝状真菌的细胞生物学技术 …… (98)
1 电子显微镜工作原理及其应用 …… (98)
2 扫描电子显微镜样品制备的原理与方法 …… (99)
3 透射电子显微镜样品制备的原理与方法 …… (101)
4 电镜细胞化学技术 …… (104)
5 免疫组化技术 …… (117)
第九章 丝状真菌的生化研究方法 …… (120)
1 概述 …… (120)
2 抽提物的准备 …… (120)
方案 1 菌丝的摇瓶培养 …… (120)
方案 2 疏水蛋白的分离 …… (120)
3 细胞组分的准备 …… (121)
方案 3 细胞膜的分离 …… (121)
方案 4 脉孢霉的液泡分离 …… (122)
方案 5 线粒体的分离 …… (123)
方案 6 细胞核的分离 …… (123)
方案 7 细胞核的抽提 …… (124)
方案 8 微体的分离 …… (125)
4 蛋白分析 …… (125)
方案 9 孢子和菌丝的小量的蛋白质抽提 …… (125)
方案 10 从固体培养物中分离胞外酶(*N. crassa* 的脂肪酶) …… (126)
方案 11 从新鲜菌丝分离细胞内蛋白,适用于蛋白水解敏感蛋白的方法 …… (126)
方案 12 从新鲜菌丝分离细胞内蛋白 …… (127)
方案 13 从冻干菌丝分离胞内蛋白 …… (128)
方案 14 酶学分析的代谢物抽提 …… (128)
第十章 真菌研究中的免疫学方法 …… (129)
1 概述 …… (129)
2 免疫原分子的特性 …… (129)
方案 1 免疫抗原的准备 …… (131)
3 制备多克隆抗血清 …… (132)
方案 2 用辛酸和硫酸铵沉淀法纯化抗体 …… (133)
方案 3 用 ELISA 测定 pAb 的滴度和检验上清液中的 mAb …… (134)
4 制备单克隆抗体 …… (135)
方案 4 通过 B 细胞-骨髓瘤细胞融合制取鼠科杂种瘤细胞 …… (136)
方案 5 荧光免疫检测 …… (138)
方案 6 限制性稀释法亚克隆 …… (139)
方案 7 冷冻法长期储存的杂交瘤细胞 …… (140)

方案 8　应用抗原介导 ELISA 鉴定 Ig 类别/亚类 …… (141)
5　蛋白质和糖类抗原决定簇的特性 …… (142)
方案 9　通过化学和酶学修饰确定的抗原决定簇的特性 …… (143)
6　其他经常使用的免疫学分析方法 …… (144)
方案 10　间接 DAS-ELISA …… (144)
7　抗体的提供及其商业发展 …… (145)
第十一章　丝状真菌的功能基因组分析 …… (146)
1　构建稻瘟病菌突变子库 …… (146)
2　目标突变技术 …… (146)
3　cDNA 文库构建及测序分析 …… (147)
方案 1　构建附着胞 cDNA 文库的 cDNA 的合成 …… (147)
4　cDNA 文库构建及筛选 …… (152)
方案 2　cDNA 文库构建 …… (152)
方案 3　质粒 pTriplEx2 的插入片段的验证 …… (155)
5　抑制差减杂交技术 …… (156)
方案 4　稻瘟病菌附着胞 SSH 差减文库的构建 …… (158)
6　丝状真菌细胞自噬及其研究方法 …… (165)
方案 5　稻瘟病菌中细胞自噬研究方法 …… (171)
方案 6　稻瘟病菌细胞自噬研究中的其他相关显微观察 …… (172)
方案 7　双分子荧光互补技术 …… (174)
方案 8　蛋白质电泳(Tricine-SDS-PAGE)及蛋白质印迹杂交 …… (176)
方案 9　酵母双杂交系统研究蛋白互作 …… (180)
方案 10　细胞表达目的蛋白 …… (184)
7　真菌中结合 PCR(Double-Joint PCR)基因融合片段操作 …… (186)
8　真菌 RNAi 技术的应用 …… (190)
第十二章　丝状真菌分子进化与系统发育分析 …… (205)
1　概述 …… (205)
2　系统发育分析方法 …… (206)
方案 1　木霉菌的 ITS rDNA 的 PCR 扩增 …… (206)
方案 2　木霉菌的 tef 1-α 基因的 PCR 扩增 …… (207)
方案 3　木霉菌进行 RAPD 研究 …… (208)
方案 4　AFLP 技术 …… (209)
3　构建系统发育树 …… (209)
第十三章　丝状真菌群体遗传分析 …… (211)
1　纯培养条件下真菌群体遗传分析 …… (211)
方案 1　Pot2-rep-PCR …… (211)
方案 2　MGR586-RFLP …… (212)
2　免培养技术用于环境中真菌群体的遗传结构分析 …… (212)
方案 3　土壤真菌 DNA 的直接提取 …… (215)

方案 4　土壤样品中真菌总 DNA 的提取 …… (215)
第十四章　真菌分子生物信息学常用软件的使用 …… (217)
1　概述 …… (217)
2　文件格式 …… (217)
3　FASTA 格式 …… (219)
4　Tab(或其他分隔符)分隔的行文件 …… (219)
5　BLAST …… (222)
6　Primer Premier 5 …… (226)
7　e-PCR …… (231)
8　Clustal …… (235)
9　BioEdit …… (237)
10　Staden Package …… (239)
参考文献 …… (249)

第一章　丝状真菌基因型特征的鉴定

1　概述

随着近30年生物技术的发展，建立了许多包括真菌在内的生物体基因型鉴定的方法。本章所介绍的方法只是其中常用的一些技术，而本章的重点是希望给科研人员提供理解基因型鉴定技术的原理和策略，从而帮助读者根据研究对象的不同，选择合适的技术回答生物学问题；同时指出信息的来源，帮助读者进一步加深对操作步骤的理解。

2　基因组变异的主要特征

尽管DNA的复制具有很高的保真性，真菌基因组变异还是持续发生：如核苷酸置换、插入、缺失事件，染色体某些基因区域及整条染色体重排、转座事件，基因从细胞质转入细胞核，甚至从其他生物体中获得遗传元件等，都可能发生。这类事件的发生虽然非常少见，但可以通过合适的遗传进化分析方法检测到特定时间的某一变异的存在，因此，真菌基因组中存在的众多DNA区域和特征就可以进行分析。任何种类真菌的基因组都可能存在这样或那样变异的区域，在相当程度上，就是我们所面临的问题所在。我们可以根据我们要检测变异的特点，选择合适的解决方法。

真菌基因组中的编码区和非编码区是能够进行区分的，编码区包括编码蛋白质的DNA序列和结构RNA的序列，非编码区包括基因间的间隔区，内元和功能未知的序列。非编码区可能被转录为RNA，也可能不转录。一般来说，编码区比非编码区具有更高的保守性。但是，即使非编码区也可能具有生物学功能，例如调节区，或者能够被转录的间隔区在转录后可以形成二级结构，有助于剪切形成正确的RNA。一般保守性高的编码区可以设计引物对内元序列进行PCR扩增，从而研究不同单元之间内元的变异特点。

基因组中序列的重复数变化很大。一些基因存在相当少的重复数，而有些序列的重复数很大。大多数编码蛋白的基因重复数很少，但这种现象与基因的功能有关。蛋白质或结构RNA需要高效率的代谢功能，结构元件需要能迅速执行生命活动，这样的基因区段在基因组中倾向于高拷贝数，使转录频率最大化。但是，重复数还受到遗传元件调节过程的影响。遗传元件对复制过程很敏感，例如在复制和转录过程中从转座子衍生出的序列可能在基因组中发生迁移。

单拷贝基因不多，这类基因往往以基因家族成员的形式出现。一个基因家族一般包含多个一致或几乎一致的基因，也经常检测到发生歧化的基因家族含有相似但不一致的基因。在许多情况下，基因家族的基因可以产生功能不同的基因产物，也有些基因是没有功能的基因或称为假基因。

许多拷贝的基因排列成串联重复形式，即同一基因的多个拷贝首尾相接。串联重复基因序列常彼此非常相似，在单个拷贝中不易出现随机突变。这种首尾重复的串联趋向同一

性，被称为一致进化(concerted evolution)。一致进化的机制虽有假说但并不清楚，这些串联重复序列的一致性对物种的研究非常有用，因为当遗传交换发生时，一致进化的许多随后机制非常有效。

一个关于高拷贝数的串联重复序列的例子是组成核糖体的编码结构 RNA 的基因(rDNA)，rDNA 是一个遗传分析的常用靶点。任何一个真菌核糖体 rDNA 重复序列至少包含 3 种基因：核糖体小亚基基因(也称为 16-18S rDNA 或 SSU)，5.8S 基因和大亚基基因(也称为 26-28SrDNA 或 LSU)。在 SSU 和 5.8S 基因之间的区段，称为内部转录间区 1，即 ITS1。在 5.8S 基因和大亚基之间的非编码区，称为内部转录间区 2，即 ITS2。这个 rDNA 可以转录形成单一的单位，然后剪切除去间区。在转录本之间还有基因间隔区，在一些担子菌中还有第四个基因：单独转录的 5S 基因。在不同的非编码区，其进化速率不同，因此，可以用来检测分类单元不同组群之间的进化历史。编码区基因虽被称为歧化区段的中度变异区域，但一般进化高度保守。ITS 区段中度变异，而基因间隔区高度变异。

在基因组中，卫星 DNA 是指在整个基因组中含有很高拷贝的相似核苷酸序列的片段。小卫星 DNA 是指 15～30bp 为核心单位的多次串联重复序列，然后形成高拷贝数的重复序列，小卫星 DNA 存在于端粒结构区。微卫星 DNA 是指 2～10bp 长度片段多次串联重复形成的高拷贝重复序列。这些序列分散分布于整个基因组中，在复制滑动、滚动环扩增、非等位基因交换过程中起作用。还有许多高拷贝重复序列不是串联重复的，但也是分散于整个基因组中，许多这样的重复序列是由转座元件通过转座衍生而来，在长期的进化过程中，拷贝数发生突变并失去转座功能，最后经过染色体重排分散于基因组中。

线粒体 DNA 也可以编码一些蛋白质和自身的 RNA。真菌的线粒体 DNA 的变异速率远高于核基因组，这样也使得线粒体基因组可以用来研究基因型。一些证据表明真菌线粒体是双亲遗传，也有重组特点。

以上这些序列片段和遗传元件都具有基因型的分子分析能力。以下我们将具体分析哪些序列区段用于哪些方面的分析，采用的分子生物学的方法有哪些。

3 确定研究目的

分子研究至少要有一至两个最初的目标：建立同一性或确定相互关系。身份(同一性)建立是要明确代表不同遗传样品的个体之间是否一致，如果样品不同，那么假设是错误的，却可经常导致复杂的问题，如这些不一致的观察值是否可以达到确定这些样品是属于不同遗传单位的显著性。确定关系假设则不同，是要试图说明由个体样品之间变异的模式引申出其系统发育关系。

在通常情况下，有三种方法来解决研究目的是同一性还是关系研究。第一个方法你可以选择一个确定位点的 DNA 区段来分析，例如 rDNA 或蛋白编码基因。选择的原因是已经知道这个区段在一个分类单元中的变异大小，或用这个引物是否可以对该基因进行有效地扩增。在这个方法中，研究人员可以在需要解决的合适变异水平上，应用预先已知的关于这个基因的遗传变异特点的知识。第二个方法，研究者可以选择 DNA 扫描方法，即任意分布在基因组始终的多个靶基因的 DNA 区段。这种方法由于靶区段是任意的，因此产生的标记可以从无变异到高变异，这样使研究者可以选择合适的特征来解决所要研究的问

题。第三个方法是更加功能性的方法，涉及用 mRNA 检测基因表达。由于这个方法是根据基因的功能，可能用来检测环境的或系统发育的不同更有价值。

4　用于基因组分析的技术

4.1　PCR 技术

虽然在 PCR 过程中有很多因素对扩增结果有影响，但引物是最有决定作用的因素。

在一定条件下，引物可以扩增出一至多条产物。为了提高产物的特异性，用于真菌基因组扩增的引物的核苷酸数目一般要 17 个以上。作为真菌，其基因组不是很大，PCR 的变性一般在温度 94℃时，几秒即可完成。但由于基因组 DNA 的提取过程也不同，其纯度也不同，因此进行一定的优化是必要的。退火温度是影响产物特异性的另一个重要因素，在实践过程中，退火温度一般采用以下的公式进行估算：

$T = Tm - 5℃$，其中 T 是退火温度

Tm 用以下公式估算：

$Tm = 4(G+C) + 2(A+T)$，其中 A、T、C、G 分别指引物中每种碱基的数目。

一般在 50μl 的 PCR 体系中，包含：

模板	1～100ng
引物 1	0.5～1 μmol/L(0.5)
引物 2	0.5～1 μmol/L(0.5)
四种核苷酸	100～400 μmol/L(200)
Taq 酶(5U/μl)	0.5～3 U
PCR 缓冲液(10×)	5μl
Mg^{2+}	1.5～3 mmol/L(1.5)
总体积：50μl	

4.1.1　引物设计

现在已经有许多通用引物的序列发表，用于对基因组中一些特定区段和特定基因进行 PCR 扩增。在这些引物中，其中一些通用引物是根据高度保守的基因区段来设计的，因此，可以从多种多样的生物中进行扩增。还有一些引物专一性高，根据一个基因或一个物种的基因区段来设计，甚至根据物种的一个变种来设计。如果一个引物设计成特异性引物，则只能从特定的群体中扩增出特异性片段。如果一个引物是通用设计，则可以从相关的不同物种中扩增出目的片段。在许多情况下，通用引物已经用于扩增不同分类单元含有变异的同源 DNA 序列片段。

与特异引物的设计相比，设计通用引物有特殊的策略，但引物设计的基本原理是相同的。用于非特异性扩增的引物一般很短(例如用于 RAPD 的引物是 10nt)，但用于特异扩增的引物一般在 18～24 个核苷酸长度。引物可以更长，但长度增加意味着如果引物序列稍有错误，则难以进行 PCR，而引物合成是有一定的错误几率的，因此扩增失败的风险增大。在这种情况下，对引物进行纯化以确保高特异性是十分必要的。

引物可以是模板序列的任何匹配序列，但是成功扩增的引物还是有一定的特征。首先，引物序列的内部重复区在扩增时可以导致形成引物二聚体。由于引物二聚体很短，它们的扩增非常有效，这将大大降低目的片段的产量。其次，引物中互补的内部重复序列可以使引物形成二级结构，叫做发夹环(hairpin loops)，也可以严重影响引物的效率。最后，如果引物的主要区域是 A/T 或 G/C，将产生极端退火最适温度，这样使一对引物联合退火温度的优化变得非常困难。因此，如果组成引物的 4 种碱基在引物中平衡分布、没有内部重复序列或互补序列区域，这样的引物会更有效。

4.1.2 特异引物与通用引物

引物与模板分子的匹配程度决定着 PCR 的特异性。通用引物 3′-端的碱基对正确扩增至关重要，因为这个区域必须在 DNA 聚合酶起始复制之前与模板紧密结合。为了增加引物的通用性，在通用引物设计时，引物的某些碱基是具有简并性的，即引物的某个位置上的碱基可能不是一种，这样增加其通用性的同时，也存在一定的风险。3′端 5 个核苷酸以内的错配显著影响引物的退火，以致常使 PCR 失败。3′端上游的不匹配对扩增的影响随扩增过程的进行而逐渐减少，特别是如果它们被匹配序列包围。但是一定程度的错配可以导致一些其他的特点。A：G 和 C：C 错配可以导致产量下降最大(约 100 倍)，A：A 错配使产量下降较少(约 20 倍)，而 T：G、T：T 和 T：C 错配导致的退火影响最小。因此，在引物设计时，对不同位点的核苷酸的选择意味着引物是特异的还是通用引物。

根据非蛋白编码区进行引物设计(例如核糖体 RNA 基因)则相对直接。不同分类单元之间的序列进行对齐排列(align)，核苷酸相同的区域(通用引物)或不同区域(特异引物)可以用来设计通用或特异引物。但是对蛋白编码区设计引物则不同。根据蛋白编码基因的氨基酸顺序设计引物相当多的依赖密码子的位置。第 1 个和第 2 个核苷酸相对保守，而第 3 个核苷酸位置核苷酸种类变化很大。当要对一个编码蛋白质的基因进行通用引物设计时，选择最小冗余 7～9 个氨基酸长度的密码子区最有用。如果选择的引物 3′端不是最小冗余的氨基酸密码子(即编码氨基酸的密码子有 2 个甚至 3 个)，很可能在这个关键区域会有不匹配的情况，这就要求 3′端 5 个核苷酸不匹配的情况必须减低到最小。

一对典型的通用引物，对来自不同单元的模板都可以应用，即所谓的“退化引物”。退化引物一般包括在多数序列中相同的核苷酸，但并不是每个待扩增的序列都完全匹配，有少数位点存在区别。在退化区域，可能存在任何 2 个、3 个甚至 4 个不同碱基，形成混合物。这样可以使引物中的一部分序列与实际的模板匹配，从而顺利完成 PCR 过程。但是依据退化的程度，匹配引物的实际浓度可能很低，势必减少产物的合成量。大多数引物合成设备能合成退化位点(degenerate position)。

4.2 单位点变异分析

在一个确定的 DNA 区域内，可以根据 DNA 片段在电泳场中的迁移速率的变化，检测不同基因型的真菌中相互联系片段内的核苷酸取代，或通过测定整个片段的碱基组成来检测其变异。片段变异的大小可以通过琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳来检测。例如，琼脂糖凝胶电泳可以实现检测 DNA 长度 5%的变异，而聚丙烯酰胺凝胶电泳可以检测 1%的差异。而 DNA 测序可以揭示一个片段最多的信息。由于自动测序仪的应用，DNA

测序已经成为劳动量和花费都在减少的检测手段。

4.2.1　RFLP 及其相关技术

限制性片段长度多态性(RFLP)分析是根据限制性内切酶的特性,限制性内切酶可以在双链 DNA 片段的特定序列(通常是 4～6 个核苷酸长度)裂解 DNA。限制性内切酶多是从原核生物体内提取的酶,这些酶在外源 DNA 进入原核细胞时可以起保护细胞的作用。

传统的 RFLP 的操作,是先将基因组 DNA 用相应的限制性内切酶裂解,酶切片段用琼脂糖凝胶分离,再转移到醋酸纤维素膜或尼龙膜上,然后与 DNA 探针杂交,过程与 Southern 印迹杂交一致,只不过 Southern 印迹杂交是一个样品用不同的限制性内切酶处理,每个泳道上一个酶切产物,不同的泳道是不同的酶切产物。而 RFLP 是不同的样品用相同的限制性内切酶处理,每个泳道上一个样品,不同的泳道是不同样品的酶切产物。RFLP 所用的探针可以是要研究的分类单元的克隆片段,也可以是相关的分类单元的克隆片段,甚至是重复元件(如微卫星片段),例如那些用于 DNA 指纹图谱(DNA fingerprinting)检测的探针。杂交探针不一定来源于已知的 DNA 片段,未知克隆和 PCR 片段都可以用作探针来检测变异。

还有一种方法,叫做 PCR-RFLP,先用 PCR 引物扩增出 DNA 片段,接着进行限制性内切酶消化,然后电泳分离酶切片段,电泳结果用溴化乙锭染色来检测酶切位点的变异。这种方法比 Southern 印迹杂交容易操作,快速且简便。

4.2.2　DGGE、TGGE 和 SSCP

还有一些技术,如变性梯度凝胶电泳(denaturing gradiend gel electrophoresis, DGGE)、温度梯度凝胶电泳(temperature gradiend gel electrophoresis, TGGE)、单链一致性多态性分析(single-strain conformation polymorphism, SSCP)等也用于区分 DNA 片段。这些方法的优点是它们不仅可以区分不同长度的 DNA 片段,还可以区分片段长度相同但有一至几个不同的碱基替换差异的片段。DGGE 和 TGGE 是根据 DNA 片段在具有梯度变性的电场中移动时,不同 DNA 片段的变性特点有差异来区分 DNA 片段的不同长度与组成(在 DGGE 中有化学变性剂,在 TGGE 中存在温度梯度)。当双链 DNA 片段通过变性梯度时,在开始变性的位置,DNA 片段在电场中的移动发生改变。由于不同序列的 DNA 片段在变性梯度电场中的变性位置不同,从而它们相互区分开。SSCP 是根据二级结构的不同来检测电泳移动过程中的差异的。

4.2.3　外元引发的内元穿越(exon primed intron-crossing, EPIC)

许多真核生物的内元附近有高度保守的位点,可以根据内元两侧的外元保守区设计 PCR 引物。这些引物可以用来扩增具有高变异区域的内元序列,这些变异可以通过 RFLP 或 DNA 测序来检测。这种方法广泛应用于动物的遗传多样性检测,也应用在真菌基因型研究中。

4.2.4　DNA 序列分析

检测 DNA 最多多态性的方法是对 DNA 目的区段进行序列分析,从而鉴定每个位置的

核苷酸种类。PCR 产物可以直接用于测序，克隆到载体上的 DNA 片段也可以进行序列测定。如果对序列多态性有所怀疑，则经常采用对克隆片段进行测序。现在 DNA 测序主要由测序公司来完成。

DNA 序列分析常用来评估系统发育中不同分类单元之间的关系。但是，DNA 序列分析不仅要有精确的核苷酸序列信息，还要对序列进行排列对齐(alignment)。排列对齐的结果最终决定分析的结果。软件可以进行排列对齐(图 1-1)，但是如果序列变异很大，排列对齐的过程非常复杂，形成的树的拓扑结构也很复杂。因此，排列对齐的计算选择对最后结果的影响非常关键。另一方面，太少的变异将产生大量的无效树，表示选择的 DNA 片断区域不能提供足够的信息来解决所要回答的问题。有许多计算机软件可以进行排列对齐，有些可以从互联网免费得到。关于用 DNA 序列分析进行系统发育研究的讨论不是本章所要讨论的范围，这方面有许多文献可以参考。

```
Dendryphiella    ACGTCTACAAGTACCTTCAGCGGTGTGTTGAGAACAACCAGGACTTCAACGTTCAGATGGCTGTCAAC
Dendryphiella    ACGTCTACAAGTACCTTCAGCGGTGTGTTGAGAACAACCAGGACTTCAACGTTCAGATGGCTGTCAAC
Dendryphiella    ACGTCTACAAGTACCTTCAGCGGTGTGTTGAGAACAACCAGGACTTCAACGTTCAGATGGCTGTCAAC
Pleospora        ATGTCTACAAGTACCTCCAGCGGTGTGTTGAGAACAACCAGGACTTCAACGTTCAGATGGCTGTCAAC
Cochliobolus     ATGTGTACAAGTACCTTCAGCGATGCGTTGAAAACAACCAGGACTTTAACGTCCAGATGGCTGTAAAA
Curvularia       ATGTGTACAAGTACCTCCAGCGCTGCGTTGAAAACAACCAAGACTTCAACGTTCAAATGGCTGTAAAA
Phaeosphaeria    ATGTCTTCAAGTACCTTCAGCGATGCGTGGAGAGCAGCACGGACTTCAACGTGCAAATGGCTGTGAAC
Phaeosphaeria    ATGTCTTCAAGTACCTTCAGCGATGCGTGGAGAGCAGCACGGACTTCAACGTGCAAATGGCTGTGAAC
Phaeosphaeria    ACGTCTTCAAGTATCTTCAGCGATGCGTCGAGAGCAGCACGGACTTCAACGTGCAAATGGCTGTGAAC
Phaeosphaeria    ATGTCTTCAAGTATCTTCAGCGATGCGTTGAGAGTAGCACGGACTTCAACGTGCAAATGGCTGTGAAC
Phaeosphaeria    ATGTCTTCAAGTACCTTCAGCGATGTGTCGAGAGCAGCACGGACTTCAACGTGCAAATGGCCGTGAAC
Phaeosphaeria    ATGTCTTCAAGTACCTTCAGCGATGTGTCGAGAGCAGCACGGACTTCAACGTGCAAATGGCCGTGAAC
Phaeosphaeria    ATGTCTTCAAGTACCTTCAGCGATGCGTCGAGAGCAGCACGGACTTCAACGTGCAGATGGCCGTGAAC
Mycosphaerella   ACGTCTACAAGTACCTGCAGAGGTGTGTAGAGAACAACTCTGACTTCAACGTGCAAATGGCTGTCAAC
Sporidesmiella   ----------ATACCTCCAGCGATGCGTGGAGAACAACCAGGATTTCAACGTTCAAATGGCCATCAAC
Dendryphiella    ATGTCTATAAGTATCTCCAGAGGTGTGTTGAGAACAACCAGGACTTTAATGTCCAGATGGCGATCAAC
Neosporidesmium  ACGTCTACAAGTATCTCCAGAAATGCGTCGAAAACAACCAGGATTTTAACGTGCAAATGGCCGTGAAC
Consensus                ** ** ***    ** ** ** *  * *    ** ** ** ** ** *****  * **
```

图 1-1　用 Bioedit 软件对 17 个序列的排列对齐结果的部分显示

4.3　多位点变异分析

基因组扫描技术，不需要预先知道相关基因组的准确信息，采用随机寡核苷酸序列引物，在多个位点区域检测 DNA 多态性。这些技术一般涉及信息未知区域，研究者不知道该区域在染色体上的位置及其功能，在扩增或检测完毕也难以完全明确这些信息。

4.3.1　RAPD 及相关技术

随机扩增 DNA 片断多态性(RAPD)是一个以 PCR 技术为基础的技术。这种技术用一个 10 个寡核苷酸长度的引物，对整个基因组区域进行片断扩增。其与 AP-PCR(arbitrarily primered PCR)技术非常相似，只不过是在最开始的几个循环用低退火温度，来确保引物和模板非特异性结合。RAPD 和 AP-PCR 的主要问题是中性标记，即产生的标记不能区别显隐性。对于二倍体时期较长的真菌，对基因频率的估计会产生问题。

一种对 RAPD 技术的改进是用两个不同的 10nt 的引物，而不是用一个引物进行 PCR 扩增。这样可以允许用 RAPD 引物从两个方向对扩增的片断进行序列测定，此操作过程称为随机引物对测序(sequencing with arbitrary primer pairs，SWAPP)。另外，对 RAPD 产生的特异性片断进行克隆，然后测序，根据测序的结果设计特异引物(18～24nt)，对特异位点的多态性进行检测，称为 SCAR 技术。SCAR 技术的重复性会大大提高。

4.3.2　DAF

DNA 扩增指纹图谱(DNA amplification fingerprinting,DAF)采用更短的 5～6nt 的序列片断作为引物,PCR 结果在琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶上可以产生重复性的谱带。DAF 结果的产生并不依赖以上所述的基因组的差异,而是一种简便、快速、敏感的方法,可以广泛应用到各种生物,例如,虽然豌豆的分子多样性很低,DAF 可以检测到从一个母本而来的高同质性的不同品种之间的多态性。DAF 能够产生比其他基因组扫描技术更复杂的指纹图谱,因此,往往需要在聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分析,采用银染的方法检测。简单的 DAF 可以用来构建遗传图谱,而复杂的 DAF 带型可以用来进行个体基因型的鉴别。

4.3.3　AFLP

扩增片断长度多态性(amplification fragment length polymorphism,AFLP)是限制性酶切和 PCR 扩增相结合产生多态性片断的技术。样品 DNA 首先用限制性内切酶消化,然后用一个寡核苷酸接头将消化的片断连接起来,连接完成后,接头序列和 3′-端随机序列为引物序列,采取 PCR 方法扩增获得一系列产物片断,然后用聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增产物进行分离。这种技术可以获得大量的多态性片断,但是这些标记可能集中在一个基因组的小范围内。

4.3.4　VNTR 位点

传统的 DNA 指纹方法许多是根据串联重复序列的不同数目(variable number tandem repeat,VNTR)位点的特性,通过与小卫星中心序列的酶切产物进行 Southern 杂交来进行的。这是一个检测多位点变异的有效工具。用微卫星序列进行 DNA 指纹分析的操作程序也很成熟。VNTR 位点也可以通过合并 PCR 引物来进行随机检测。小卫星和微卫星中心序列都可以合并到 PCR 引物序列中,从而丰富了对 VNTR 位点的扩增产物。

虽然 VNTR 位点分散于整个基因组中,根据 VNTR 位点两侧保守序列设计引物进行 PCR 扩增,也可以检测单个包含微卫星 SSR 序列的 VNTR 位点。但是,如果引物不能从相关的生物中扩增出片断,则需要对围绕 VNTR 位点的序列进行相当的研究,以得到足够的可供引物设计的信息。一旦引物获得了,只需要对少数位点进行取样分析就可以揭示相当多的遗传变异。部分原因是 SSR 序列的重复数有相当大的突变率,产生的标记也是共显性的。

上述许多技术可以相互结合,从而增加了标记谱带的复杂性,即对于同一组样品,采用不同的方法,对结果进行综合分析,可以对研究的问题得出比较科学的答案。

4.4　环境样品的分析

从环境样品中如土壤、植物组织、泥土、水体等进行 PCR 扩增,通用引物的选择是关键。为了避免对非真菌材料进行扩增,采用对真菌有选择性的引物是必要的。对于核糖体基因,已经有针对真菌设计的通用引物如 ITS1F 和针对担子菌的 ITS4B。还有如 NL6Amum 针对于 Pezizales,NL6Bmum 针对担子菌。

为了分析环境样品中真菌的群体,在 PCR 过程中,要采用避免从单个个体中扩增出多

条片段的技术，否则将难以进一步分析特异的遗传变异。从环境样品中进行群体扩增的技术包括基因组扫描技术和限制性内切酶消化技术。对 PCR 片断混合物是不能进行序列测定的，因此，首先要对从环境样品中扩增出的产物进行有效的分离。如果扩增产物只是长度上存在差异，用一般的电泳技术就可以完成。或者对这些片断进行克隆，将它们连接到一种质粒载体上，对克隆进行序列分析，从而评估环境样品中真菌群体的异质性特点。

为了对从环境样品中 PCR 扩增出的产物直接进行检测，许多特殊的电泳方法已经用于分离这样的 PCR 产物。DGGE、TGGE 及相关的一些其他技术已经用于对混合 PCR 产物进行分离分析。DGGE 可以分析从环境样品中扩增出的混合扩增产物，这已经成为普遍应用的分析方法。

将片断自动分析仪（如 DNA 测序仪等）与酶切技术相结合，称为 T-RFLP 技术（terminal restriction fragment length polymorphism）。在对环境样品进行 PCR 之前，将引物标记上荧光分子（如果标记 2 种引物或更多引物，每种引物标记上不同的荧光分子）。PCR 完成后，用限制性内切酶对扩增产物进行酶切，酶切产物用片断自动分析仪检测。采用这种方法，研究者很容易评估一个混合 PCR 产物的差异，可以直接对不同环境样品中的生物群体和群落特征进行评估。这种方法还可以用相应基因保守区的序列设计的引物进行 PCR，监测环境因素对相应基因的影响。

4.5 表达基因的分析

RNA 指纹技术基本原理与基因组扫描技术相同，只是模板是由 mRNA 反转录形成的 cDNA。只有表达的基因可以形成 mRNA。真核生物的 mRNA 有一个 poly(A)尾。这样，可以用 Poly(T)为引物，在反转录酶的作用下，将在一定条件下基因表达形成的 mRNA 反转录成 cDNA。或者用短序列随机引物进行反转录，然后进行 PCR 扩增。之后的过程与其他基因组扫描技术的操作相同。所获得的片断是基因的表达序列或基因的蛋白质编码序列，可以经标记后作为探针，用于群体特征研究、系统发育研究等。

5 假设

以上提到的技术，是以一些既定的假设为基础的。假设所用的标记是可以遗传的，并且其遗传模型是已知的。有些标记可能是不遗传给后代的，如许多 RAPD 扩增片断是由于引物与模板在低退火温度下错配而形成的，这样的标记并不遗传给后代。有些遗传模型也不符合孟德尔遗传规律。当然这是针对于核基因组，有些细胞质基因组，如线粒体，其遗传是来自母本。但是，由于核基因组在遗传中的决定性作用，假定符合孟德尔遗传规律的假设一般是正确的。

有些类群的真菌，其单倍体时期和双倍体时期都比较长，因此对可以产生显性标记的技术，应用时要特别注意。当真菌处于双倍体或双核期时，采用能够产生显性标记的技术进行群体结构研究将受到限制。由于显性标记不能区分杂合体时期的显性纯合体和杂合体，对于等位基因频数的估计是存较大误差的，而对于是单倍体的群体，则不存在这个问题，这些技术就如同共显性标记。

在技术的选择上，重复性是一个值得考虑的因素。在以上所述的技术中，RAPD 技术

的重复性最差，许多试验条件参数的改变都会影响到其结果，从而使其结果的重复性不稳定。还有如 RFLP 技术，由于要将电泳后分离的 DNA 片断转移到杂交膜上，再与探针杂交，最后通过洗膜、显色，才能获得最后的结果，洗膜的程度将严重影响最后的显色。因此，RFLP 技术的重复性也不是很稳定。

在 PCR 过程中，一个很基本的假设是扩增产物就是所需要的 DNA 片断。当采用特异引物，在严谨的 PCR 条件下，该假设一般是正确的。但是，当采用非严谨的退火条件，而引物的特异性也不是很强时，就会产生问题。如果要比较的片断不是来自相同的位点，但由于非特异性扩增而产生了相似的带型，则由此得出的分析结果也将是不正确的。对于通过均一电场电泳获得的 DNA 谱带，一个基本的假设是相同迁移距离的片断是相同的片断，但实际上相同迁移距离的片断只是长度相同的片断，其核苷酸组成不一定完全相同。例如根据 RAPD 扩增获得的 DNA 片断，或者通过 RFLP 获得的相同位置的谱带，都可能不是同一条带。对于这些问题，DGGE 和 SSCP 是解决问题的手段。

如果选取进行序列分析的 DNA 片断与要分析的分类单元的进化祖先无关，则分析的结果很可能不能反映真正的进化关系。理想的选择是对那些正向同源基因（例如有线索表示这些基因与物种的形成和分化有关）进行比较分析。也可以对共生同源基因（平行进化同源基因）进行对比分析（特别是有线索表明一些基因与祖先的基因复制事件有关）。一个共生同源基因发生的例子是扩增并分析存在于一组样本中的一个功能基因，而在另一组样本中这个基因家族的基因却是假基因，这些基因具有相同的引物序列，但是这个基因的复制事件发生于物种形成事件之前，则可能与物种的形成无关。实际上，当采用核糖体基因进行系统发育研究时，我们比较的就是共生同源基因（平行进化同源基因），但由于串联重复序列在协同进化中的趋势，因此其行为类似于正向进化同源基因。另一个假设是基因由祖先转移而来（例如是由亲代传递给后代）。但是，横向基因（lateral gene，又称水平基因，horizontal gene）在种间的传递已经观察到（横向基因传递称为寄生同源），并已经在基因亲缘关系分析中得到证明。

同源基因，无论是正向进化同源，共生进化同源还是寄生进化同源，都可能结合在一起，从而增加了分析的复杂性，形成嵌花式进化而形成不同的进化历史。这种结合进化甚至可以发生在 PCR 反应体系中，称为“PCR 跳跃”。如果引物载体系已经部分延长，可以通过变性，在下一个循环过程中，经退火，结合在模板的有一定同源性的其他区域，从而进行与预先预期的结果不同的扩增。这在进行系统发育分析中将产生重要问题。

从环境样品中进行 PCR 扩增时获得的产物是由很多不同片断组成的混合物。这里的基本假设为所有模板上相同引物的扩增效率是一致的。虽然这是当所有模板的引物结合的位点完全相同时的预想情形，但实际上，样品中的不同模板在引物结合区域的突变是不同的，这也就引起了不同模板之间的扩增效率不一致。这样，在 PCR 产物中存在的不同片断之间的比例反映的是扩增效率的比例而不是样品中不同生物样品 DNA 分子数之间的比例。混合模板在进行 PCR 时对 PCR 跳跃也很敏感。

6　选择最佳策略

根据研究对象和所要解决的问题来选择所要采取的方法和选取的 DNA 区段。真菌的

基因组包含了高度保守的序列，也含有高度变异的序列。在基因型研究中，选择合适的技术，对有足够变异的 DNA 区段进行分析，是解决问题的关键。而对于研究对象遗传特性的掌握是实现正确实验设计的依据。

6.1 区分个体和群体

真菌的个体是真菌中最基本的单位，个体的概念是一个形态学或遗传学术语。真菌个体的形成是由有丝分裂形成的多细胞无性系，可以包括许多的形态结构，如菌丝体、分生孢子、菌核、子囊果、担子果等。是由许多异质性的个体组成的群体，彼此一致又与其他群体有区别。一个新个体的形成过程主要有两种途径：第一种途径，在具有双倍体或双核体的真菌菌丝体（例如担子菌或卵菌）中，两个遗传性质不同的配子体核可以形成新的基因型个体。在具有单倍体细胞的菌丝体（如主要的子囊菌和接合菌）中，所有新的无性系都来自两个遗传上不同的配子体细胞核的融合及减数分裂。另外，自然突变也是一种新个体形成的方式，对于在自然条件下难以进行有性生殖的真菌类群，由于其可以产生大量的分生孢子，在自然条件改变时，会使含有突变基因的新个体显现出来（如植物病原菌新小种的出现、新抗药性菌株的出现）。还有一些地衣真菌，常常认为是同一个个体的分离物，却可以表现出不同的化学性质。因此，在真菌中是否属于同一个个体有时也不一定容易确定。

对同一个种的不同个体的遗传变异的研究是群体遗传学的主要内容。用于这类研究的分子生物学技术要能够检测高水平的变异。由于在一个种内的变异很小，要选择可以区分个体基因型的区段或者具有很高变异水平的单位点进行分析，或者选用基因组扫描技术对整个基因组的变异进行研究。适合于对基因组多位点变异进行检测的分子生物学技术主要有：RFLP、RAPD、AP-PCR、DAF、AFLP、VNTR 等。

EPIC 技术可以对一些基因或区段的高变异区进行分析，也可以用于群体遗传学研究。如在真菌中已经对 β-微管蛋白的内含子区段进行镰刀菌群体遗传学的研究。

RAPD 技术可以用于比较不同群体之间的遗传差异，也可以用于比较不同物种之间的遗传差异分析。DAF 技术也可以进行群体遗传学研究，而且可以得到比 RAPD 技术更多的分子标记。而 AFLP 分析也很适合于检测群体水平的变异，可以获得比其他方法更多更稳定的分子标记。分散性的重复序列也是比较理想的分析群体之间差异的技术，以此为基础的 DNA 指纹技术可以用于不同个体之间的亲缘关系的分析和遗传。虽然小卫星 VNTR 位点在真菌中显示其变异不大，但在研究互交不育群之内和之间的遗传交换方面已经得到应用，证明这种技术可以用于一些个体基因型的研究。

6.2 区分近缘物种

真菌种级水平的差异主要是由于遗传上的变异。部分的原因是由于群体遗传因子，例如一个物种的起源（特别是地理隔离形成的平行进化）、遗传交换机制及分散机制等。但是，物种变化的主要原因是基因歧化发生后又经过了长时间的进化，物种在长时间的进化过程中，积累了大量的核苷酸替代，分化时间越久，替换越多。对此的检测必须选择合适的方法，对合适的基因区段进行分析。

虽然没有任何一种技术或 DNA 区段可以保证解决所有的真菌种级水平的变异检测，但是有一些区段已经广泛地用于这类研究来评估种级亲缘关系。例如 rDNA 的 ITS 区段、

大亚基的部分序列(LSU)等。对于亲缘关系很近的种类,可以选用 IGS 区段,IGS 区段含有很高的变异,可以用于生物种的区分,甚至不同菌株的区分。此外还有 β-微管蛋白基因、转录因子Ⅱ蛋白基因等,也用于种级系统发育研究。除了序列分析,RFLP、DGGE、SSCP 等技术也用于种级分类研究。

6.3　更高级分类单元

对于种级以上分类单元的比较,需要选择变异不大,保守性很高的区段进行分析。由于高级分类单元之间是独立进化很长的时间,已经积累了大量的突变,要找到可以进行高级分类单元差异的鉴定区段非常困难,因此,对于高级分类单元的研究目的主要是明确它们之间的亲缘关系而不是鉴定特定的分类单位。经过很长时间后,含有高变异的区段已经不能使用,因为其相应核苷酸的替换已经发生了很多次,甚至有很多的恢复突变,使对同源基因区段变异水平的正确评估非常困难,虽然已经发生了很多替换,但却检测不到。这种"噪音"的积累将掩盖真正有用的信息。高级分类单元的系统发育分析要对高保守序列区段进行分析,例如 rDNA 的小亚基区段(SSU),或者是基因编码区。由于单个区段或者含有许多噪音,或者变异很少,有时对多个片断进行联合分析,往往可以获得较理想的结果。

方案 1　链格孢真菌的 RAPD 分析

1. 收集菌株　从野外采集标本,分离菌株。

2. 菌体培养　从在 PDA 平板上培养 3 天的菌落边缘取 2mm×2mm 的菌丝块,接种到 100ml 的 PD 液体培养基中,25℃条件下摇床 150r/min 震荡培养 3～7 天,4 层纱布过滤菌体后,用无菌水洗 2 次,再用灭菌的生理盐水洗 2 次,用灭菌的吸水纸吸去水分,－20℃冰箱过夜,备用。

3. DNA 的提取和纯化　CTAB(cetyltriethylammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵)法

(1) 试剂配制

1) 5mol/L NaCl。

2) 巯基乙醇。

3) CTAB

a. 配 2mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)

b. 配 0.5mol/L EDTA 缓冲液(pH8.0):①EDTA · Na_2 · $2H_2O$,相对分子质量 372.24,取 186.12g EDTA · Na_2 · $2H_2O$ 用双蒸水(ddH_2O)800ml 溶解,后用 NaOH 20g 调节 pH8.0,加 ddH_2O 至 1000ml。②CTAB 提取缓冲液[2%(V/W)CTAB;1.4mol/L NaCl;20mmol/L EDTA;100mmol/L Tris-HCl(pH8.0);2% β-巯基乙醇](使用前加入)。

4) PVP:聚乙烯吡咯烷酮。

5) 石英砂。

6) 氯仿/异戊醇(24∶1)。

7) 异丙醇。

8) 75%乙醇溶液。

9) TE 缓冲液(pH8.0)(10mmol/L Tris-HCl,1mmol/L EDTA)。

10) RNase A(10mg/ml)。

11)无水乙醇。

(2) 仪器。

1) 冰冻高速离心机。

2) 液氮罐。

3) 台式离心机。

4) 电热衡温水浴锅。

5) 电热衡温培养箱。

6) 电冰箱。

7) 离心管和移液吸头。

(3) 操作步骤

1) 在 1.5ml 离心管中加入 700μl CTAB 缓冲液。

2) 取 0.12g 菌丝,在液氮中(加 0.01gPVP,石英砂)迅速研磨成粉末后,把粉末转入含 CTAB 缓冲液离心管中,上下颠倒数次使之混合均匀。

3) 于 65℃水浴保温 0.5～1h。

4) 冷却至室温后,加入等体积(700μl)的氯仿/异戊醇(24∶1),颠倒混匀 10min。

5) 离心(10 000r/min,10min,室温),去沉淀,将上清液转入另一离心管中。

6) 在上清液中加入等体积异丙醇,轻缓颠倒混合均匀,室温放置 10～20min。

7) 离心去上清液(10 000r/min,10min,4℃)。

8) 用 100μl 75%乙醇溶液洗涤 2 次以去除盐(可置－20℃冰箱过夜)。

9) 倒去 75%乙醇溶液,37℃干燥 20min,溶于 600μl TE 缓冲液,转移至 1.5ml 离心管。

10) 加入 5μl RNase A(终浓度为 50μg/ml),37℃保温 30min(可在－20℃冰箱中过夜)。

11) 用等体积饱和酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)抽提 1～3 次(视材料等情况而定)。

12) 用等体积氯仿/异戊醇(24∶1)抽提 1～3 次(视材料等情况而定)。

13) 离心(10 000rpm,10min,4℃),吸取上清液转移到一个新的 1.5ml 离心管中。

14) 上清液加入 1/10 体积 4mol/L NaCl(终浓度 0.1～0.4mol/L)溶液后,加入 2 倍体积无水乙醇,放置 20min 后,10 000r/min 15min,离心沉淀 DNA。

15) 沉淀用 75%乙醇溶液(－20℃)洗涤 2～3 次,37℃保温箱中干燥后(除乙醇)溶于适量的 TE 缓冲液(50μl)中 4℃备用。

4. 引物筛选

(1) 用 3 个已经明确其为不同基因型的代表菌株各 1 株,提取 DNA 后,分别逐个地用供选的随机引物进行扩增,从中筛选出适合于链格孢真菌 RAPD 分析的随机引物。扩增程序为:94℃变性 2min;以后 94℃变性 40s,37℃退火 1min,72℃延伸 1min,共 40 个循环。最后 72℃延伸 6min。扩增产物在 1.4%的琼脂糖凝胶上,用 TBE 电泳缓冲液,上样 8μl,4V/cm 电泳 3h,溴化乙锭染色,254nm 紫外光下检测、照相。重复 2 次。

(2) 另一个引物筛选的方法是:从供试的每个菌株的 DNA 中取等量的 DNA 混合,以此混合物为模板,对所要筛选的引物进行扩增、电泳,方法同上。选择扩增出 2～5 条明确的

条带的引物作为用于 RAPD 分析的引物。这种方法对于群体遗传分析是快速的筛选方法。

5. RAPD 扩增　对供试菌株进行 RAPD 扩增的 25μl 体系中包括：10×反应缓冲液 2.5μl；Mg^{2+} 1mmol/L；10 碱基随机引物 5pmol；dNTP 200μmol/L；Taq 酶 1.5U（上海生物工程有限公司）；DNA 10～50ng。扩增程序为：94℃变性 2min；以后 94℃变性 40s，37℃退火 1min，72℃延伸 1min，共 40 个循环。最后 72℃延伸 6min。扩增产物在 1.4%琼脂糖凝胶上，用 TBE 电泳缓冲液，上样 8μl，4V/cm 电泳 3h，溴化乙锭染色，254nm 紫外光下检测、照相。重复 2 次。

6. 数据处理　用公式 $\ln Y = AX + B$ 计算扩增产物的分子质量。其中：Y 表示 DNA 的大小（bp）；X 表示 DNA 片段电泳的迁移距离；A、B 为系数。分子质量不超过 3%的变异认为是相同大小的片段。对于相同分子质量的 DNA 片段，重复扩增出的编码为“1”，没有重复扩增的编码为“0”，计算各样品间的相似系数 $S = 2N_{AB}/N_A + N_B + N_{AB}$，其中 N_A 为 A 样品特有的带数，N_B 为样品 B 特有的带数，N_{AB} 为样品 A、B 共有的带数。遗传距离 $D = 1 - S$。用相应软件进行聚类分析，采用 UPGMA 法聚类。

7. 分析结果。

7　AFLP 技术的原理及其应用

AFLP 技术是将限制性酶切技术和 PCR 反应相结合的分子标记方法，具有重复性好、灵敏度高的优点。由于不同物种、品种、品系甚至个体之间的基因组不同，当用限制性内切酶消化 DNA 时，会产生分子量大小不同的限制性酶切片段。这种不同体现了相应酶切位点上核苷酸组成的不同，即检测的是酶切位点的多态性。酶切后再使用特定的双链接头与酶切 DNA 片段连接，作为 PCR 扩增的模板。PCR 扩增的引物含有人工接头序列、酶切位点序列和选择性碱基，这样扩增的结果是只有与选择性引物匹配的片段得以扩增，从而减少了 RFLP 所必需的探针制备和杂交过程。扩增结果通过测序胶电泳分离，用放射性同位素标记检测或者通过银染检测。AFLP 技术与 RFLP 技术相比，省时省工，易于操作。与 RAPD 技术相比，重复性好，检测的多样性多。现在已经有商品化的试剂盒供应，使 AFLP 技术的具有更好可操作性。

AFLP 分析一般应用两种限制性内切酶在适宜的缓冲系统中对 DNA 进行酶切。一种为识别位点为六碱基的低频剪切酶，另一种为识别位点为 4 碱基的高频剪切酶。这样 2 种酶搭配，双酶切产生的 DNA 片段长度一般小于 500bp，在 AFLP 扩增反应中可被优先扩增，扩增产物经过聚丙烯酰胺凝胶电泳，可被很好地分离。目前常用的 2 种酶一是 *Mse* I，识别位点是 4 个碱基对；二是 *Eco*R I，识别位点为 6 个碱基对。

AFLP 接头和引物都是经过人工设计合成的。接头和引物在使用时是双链的，合成时分别合成单链，经在试验室中退火形成双链。人工接头（artificial adapter）一般长 14～18 个碱基对，由一个核心序列（core sequence）和一个酶切位点的尾部序列组成。AFLP 引物序列由 3 部分组成：5′端含有人工接头的核心序列（core sequence，CORE）和限制性内切酶的特定尾部序列（酶切位点序列经过酶消化处理后的尾部序列）及 3′端的带有 2～3 个的选择性碱基。AFLP 分子标记技术流程见图 1-2。

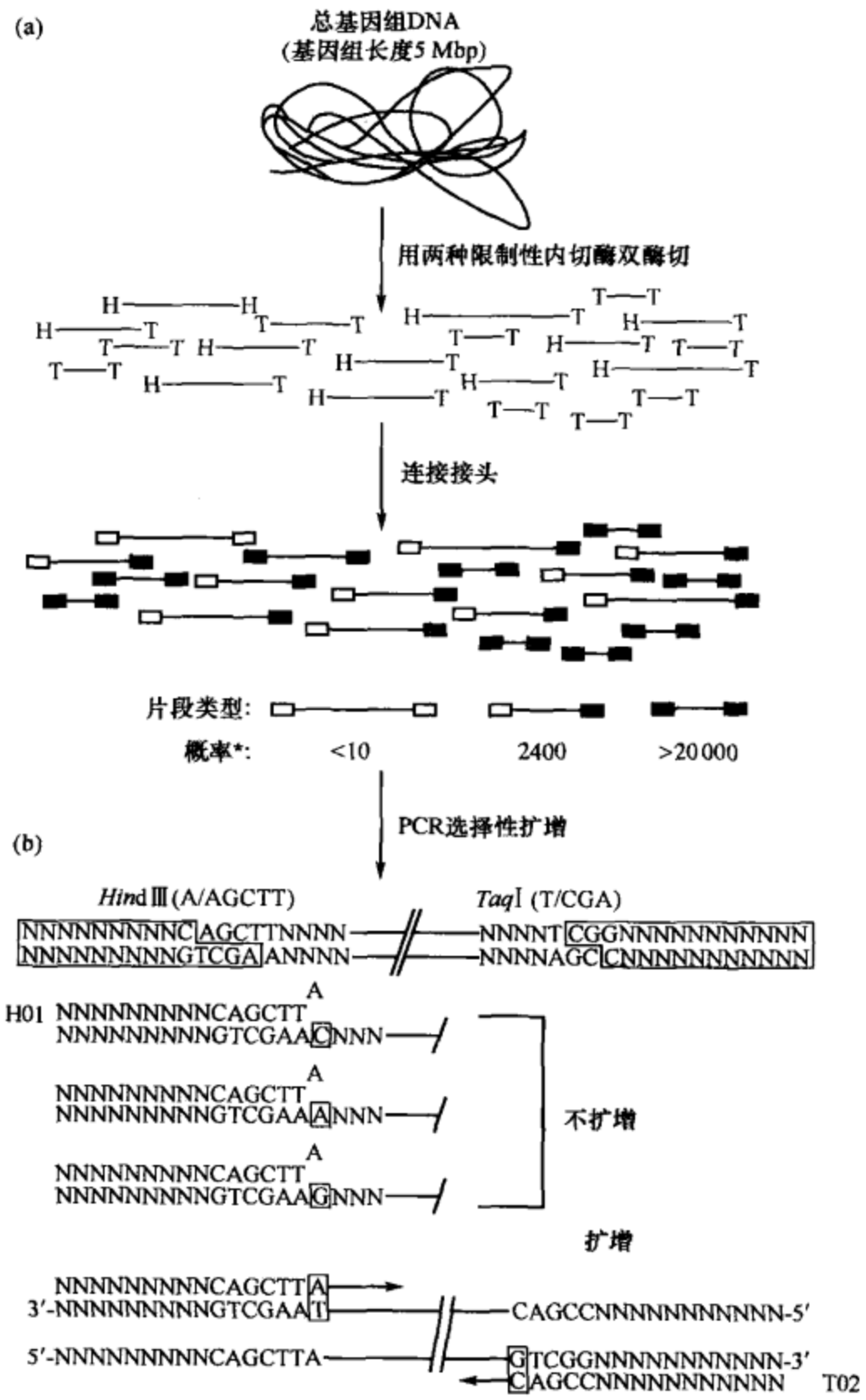


图 1-2 AFLP 技术的流程(引自 Janssen et al, 1996)

7.1 AFLP 分析所需的引物和接头的设计合成

接头的设计是根据人工接头和酶切位点相结合的原理,人工接头中有 10～14 个互补的碱基,两端各有一段单链的尾部,5′端的单链为了保证两个接头不能连接,3′端连接有酶切序列的末端,以便使接头能够与目的 DNA 片段有效连接。通常,我们选择 *Eco*R Ⅰ(识别序列是 6 个碱基,酶切末端是 AATT)和 *Mse* Ⅰ(识别序列为 4 个碱基,酶切末端是 AT)。

以下是经常用的 2 个接头序列:*Eco*R Ⅰ 接头 1:5′-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3′,*Eco*R Ⅰ 接头 2:3′-CAT CTG ACG CAT GGT TAA-5′。*Mse* Ⅰ 接头 1:5′-GAC GAT GAG TCC TGA G-3′,*Mse* Ⅰ 接头 2:3′-TAC TCA GGA CTC AT-5′。

4 条接头分别合成，分别配成浓度为 100pmol/μl 的储备液储存备用；然后在 PCR 仪上形成双链接头。

接头的制备：将 *Eco*R Ⅰ接头上下链（*Eco*R Ⅰ接头 1 和 *Eco*R Ⅰ接头 2）稀释成 5 pmol/μl 的浓度，等体积混合后，在 PCR 仪上以下列程序进行接头的退火，形成双链：

94℃　3min；

65℃　10min；

37℃　10min；

25℃　10min；

完成后于－20℃保存备用。

分别取 *Mse* Ⅰ上下链等体积的量混合配成 50pmol/μl 的浓度，混合均匀后，在 PCR 仪上以下列程序进行接头的退火，形成双链：

94℃　3min ；

65℃　10min；

37℃　10min；

25℃　10min；

完成后于－20℃保存备用。

引物的设计由接头序列、酶切位点的尾部序列和选择序列 3 部分组成。分为 2 种：一是预扩增引物，选择性序列只用一个选择性碱基；二是扩增引物，在预扩增引物的基础上再增加 2 个碱基。这样，如果要将所检测的样品尽量多的覆盖，需要设计多对引物，进行多次电泳检测，以获得尽量多的多态性。

例如，按照上面的接头序列，可以设计的预扩增引物如下。

对应 *Eco*R Ⅰ接头序列，预扩增引物是：ECOR00：5′-GAC TGC GTA CCAATT C-3′。

对应 *Mse* Ⅰ接头序列，预扩增引物是：MSE00：5′-GAT GAGTCC TGA GTAA- 3′。

而扩增引物可以是：

对应预扩增引物 ECOR00 的部分扩增引物：

5′-GAC TGC GTA CCA ATT CAC-3′

5′-GAC TGC GTA CCA ATT CAG-3′

5′-GAC TGC GTA CCA ATT CAT-3′

5′-GAC TGC GTA CCA ATT CAA-3′

5′-GAC TGC GTA CCA ATT CCC-3′

5′-GAC TGC GTA CCA ATT CCG-3′

5′-GAC TGC GTA CCA ATT CCA-3′

5′-GAC TGC GTA CCA ATT CCT-3′

等；

对应预扩增引物 MSE00 的部分扩增引物：

5′-GAT GAGTCC TGA GTA AAC- 3′

5′-GAT GAGTCC TGA GTA AAG- 3′

5′-GAT GAGTCC TGA GTA AAA- 3′

5′-GAT GAGTCC TGA GTA AAT- 3′

5′-GAT GAGTCC TGA GTA ACC- 3′
5′-GAT GAGTCC TGA GTA ACG- 3′
5′-GAT GAGTCC TGA GTA ACA- 3′
5′-GAT GAGTCC TGA GTA ACT- 3′
等。

在应用时，2 组中的任意一条引物，可以与另一组中的任意一条引物组合，进行 PCR 扩增。如以上 2 组引物，可以组成 64 对扩增引物。因此，在对所有样品进行正式扩增前，还需要对所有引物对进行初筛，选出合适的引物进行正式试验研究。

7.2 DNA 的酶切处理

AFLP 分析中常用的 2 个限制性内切酶组合 *Eco*R I 和 *Mse* I。*Eco*RI 的识别位点为 6 个碱基，*Mse* I 的识别位点为 4 个碱基。这样的酶切结果产生了比只用识别位点为 6 个碱基的 2 个限制性内切酶酶切时更多的片段。在以后的连接过程中，可以产生更多的多态性。

方案 2 丝状真菌的 AFLP 分析

设备与仪器：

1. 仪器设备 液氮罐、研钵、水浴锅、台式离心机、冷冻离心机、PCR 仪、测序胶制备设备、电泳仪、制冰机、显色盘、离心管、移液吸头等。

2. 试剂 DNA 提取试剂、限制性内切酶、琼脂糖、丙烯酰胺凝聚储备液、显色液、固定液、洗脱液、电泳缓冲液、上样缓冲液等。

方法与步骤：

1. 基因组 DNA 的提取 采用 CTAB 法，在提取时一般先用酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)萃取，再用氯仿/异戊醇(24∶1)萃取除酚及蛋白质，具体步骤参见第二章方案 1 中稻瘟病菌 DNA 的提取方法。

2. 限制性酶切 在 PCR 管中按表 1-1 加入酶切反应组分。

表 1-1 限制性酶切

组分	体积(μl)	组分	体积(μl)
10×缓冲液 R*	5	*Eco*R I(10 U/μl)	1
基因组 DNA(200ng/μl)	5	ddH_2O	38
Mse I(10 U/μl)	1	总体积	50

* 限制性内切酶选用 Fermentas 公司的产品。如果是其他公司的产品，选用公司推荐的合适缓冲液。

限制性内切酶的量以 1μg DNA/8～10U 为宜。酶切时间根据基因组 DNA 的质量的不同有所差异，质量越好，所需时间可适当缩短。

加好后轻轻混匀，瞬时离心后，在 PCR 仪上进行酶切反应。

反应程序为 37℃ 2～3h，80℃10min。

反应后立即置于冰上，或者于－20℃保存备用。

3. 酶切产物与接头的连接 在 PCR 管中，按表 1-2 所示的连接体系加入各个组分。

表 1-2　酶切产物与接头连接

组分	体积(μl)	组分	体积(μl)
基因组 DNA 酶切产物	40	T4 DNA 连接酶(5U/μl)	1
*Eco*R Ⅰ接头(5pmol/μl)	2	T4 DNA 连接酶 缓冲液	5
Mse Ⅰ接头(50pmol/μl)	2	Total	50

轻轻混匀后，16℃连接过夜，然后于 70℃处理 20min 使酶失活，然后于－20℃保存备用。

4. AFLP 的预扩增　预扩增的目的是将多态性片段富集，使以后的正式扩增的稳定性增加。

(1) 按表 1-3 所示的预扩增体系，在 PCR 管中加入各个组分：

表 1-3　预扩增体系

组分	体积(μl)	组分	体积(μl)
10× Ex Taq 缓冲液	5	Ex Taq 酶(5U/μl)	0.25
4 种脱氧核苷酸混合液(2.5 mmol/L)	4	连接产物	5
引物 ECOR00(10 pmol/μl)	1.5	ddH_2O	32.5
引物 MSE00(10 pmol/μl)	1.5	总体积	50

(2) 轻轻混匀，瞬时离心，放入 PCR 仪中。

预扩增程序为：94℃，变性 2min；然后按以下参数进行 20 个循环：94℃，30s；60℃，1min；72℃，2min。

循环后 72℃延伸 7min，结束预扩增。

(3) 取 5μl 预扩增产物于 1.0%的琼脂糖凝胶上电泳，检测预扩增效果，其余预扩增产物保存于－20℃备用。

5. AFLP 的选择性扩增(正式扩增)　预扩增产物稀释 100 倍后，作为选择性扩增的模板，于－20℃保存备用。

(1) 在 PCR 管中按表 1-4 加入下列组分。

表 1-4　预扩增产物稀释

组分	体积(μl)	组分	体积(μl)
10× Ex Taq 缓冲液	2	Ex Taq 酶(5U/μl)	0.2
4 种脱氧核苷酸混合液(2.5 mmol/L)	1.6	100×预扩增产物	1
扩增引物 1(10 pmol/μl)	0.5	ddH_2O	14.2
扩增引物 2(10 pmol/μl)	0.5	总体积	20

(2) 轻轻混匀，瞬时离心，放入 PCR 仪中。

选择性扩增程序为：94℃，变性 2min；然后按以下参数进行 12 个循环：94℃，30s；

65℃,30s; 72℃,1min; 再按以下参数进行 36 个循环:94℃,30s; 56℃,30s; 72℃,1min。循环后 72℃延伸 7min,结束选择性扩增。PCR 产物保存于−20℃备用。

6. AFLP 的聚丙烯酰胺凝胶电泳

(1) 凝胶板的硅化处理:用 0.5%的 Bind-Silance 处理长玻璃板以使凝胶与之有效粘贴,用 Repel-Silance 处理小玻璃板,可使凝胶在电泳后易于从玻璃板上剥离。

1) 用洗洁精将玻璃板洗涤干净,并用 ddH_2O 漂洗 3 次,晾干。然后用脱脂棉蘸无水乙醇擦洗,晾干。重复 1 次。

2) 短板处理:将 3ml Repel-Silane 涂布于小玻璃板未刻标记的一面,用脱脂棉将其涂布均匀。室温干燥 5min 后,再用无水乙醇擦洗 1 遍,晾干。

3) 长板处理:将 1μl 的 Bind-Silance 加入 1ml 含 5%醋酸的 95%乙醇溶液中(950μl 乙醇溶液中加入 50μl 醋酸),充分混匀。将大玻璃板未刻标记的一面向上放平,然后将前述混好 Bind-Silance 的乙醇溶液全部加到大玻璃板上,用脱脂棉均匀涂满整个表面,室温晾 5min,然后用无水乙醇擦洗 1 遍。

4) 将处理好的玻璃板置于制胶模具上,加好间隔条、加样梳,夹好金属夹,准备灌胶。

(2) 凝胶的制备及灌胶

1) 配制 40%(Acr∶Bis=19∶1)的丙烯酰胺贮存液,于 4℃保存。

2) 用丙烯酰胺贮存液配制 6%的胶。

3) 在丙烯酰胺中迅速加入 TEMED 30μl,10%新鲜配制的过硫酸铵 300μl,混匀。

4) 将长板微微倾斜,用 50ml 注射器吸取凝胶,沿着长板的边缘,缓慢注入准备好的模具中。可边灌胶边用吸耳球轻拍玻璃板,以防气泡的出现。

5) 胶注满模具后,平端梳子,缓缓推入灌胶口,深度约 1cm,用保鲜膜包住灌胶口。

6) 室温静置,待胶完全凝聚,即可上样电泳。

(3) 电泳

1) 配制 10× TBE 电泳缓冲液。

2) 用两手捏住梳子,轻轻从完全凝聚的胶板上拔出,将凝胶板安装到电泳槽中,上下电泳槽内各加入适量 1× TBE 电泳缓冲液,接通电源 90W 恒功率预电泳 30min。

3) 用移液枪小心冲洗凝胶上界面,冲去析出的尿素和碎胶,插入鲨鱼齿梳子。

4) 在扩增产物的 PCR 管中加入 4μl 6×上样缓冲液,混合后置于 PCR 仪上,95℃变性 5min,立即置于冰上,静置几分钟后点样。

5) 每个点样孔上样 5μl。

6) 接通电源,恒定功率 70W 电泳。

7) 当溴酚蓝指示带移动距离胶底 2cm 左右,停止电泳。

(4) 凝胶染色

1) 按照以下浓度配制银染试剂:

固定液:1.8L 中加入 200ml 冰醋酸。

染色液:在 2L ddH_2O 中加入 2g $AgNO_3$ 和 3ml 甲醛。

显色液:60g Na_2CO_3 溶于 2L ddH_2O 中,冰浴至 10℃,使用前加入 37%甲醛 3ml 和 10mg/ml $Na_2S_2O_3$ 400μl。

2）银染操作步骤

a. 凝胶的固定：在固定专用水箱中入 3L 固定液，将凝胶取下，放入固定液中，置于摇床上 90 r/min 振荡 20min 或直至样品中染料完全消失，凝胶也可在固定液中不振荡保存过夜。

b. 洗胶：倒去固定液，用 ddH_2O 振荡洗胶，90 r/min 振荡 10min。从水中取出凝胶，竖直胶板静止 10～20s，使水流尽。

c. 凝胶染色：将凝胶转移至染色溶液 90 r/min 振荡 30min。

d. 洗胶：从染色溶液中取出胶板放入 ddH_2O 的中浸洗 4s。

e. 显影：在 10℃预冷好的显影液中加入 37%甲醛 3ml 和 10mg/ml 的 $Na_2S_2O_3$ 400μl，将洗后的凝胶立即放入显影液中，90 r/min 充分振荡，直至条带全部显现。

f. 固定凝胶：将固定液（10%醋酸溶液），直接倒入显影液中，固定 5min，终止显色。然后用 ddH_2O 漂洗 2min。

g. 结果记录：用凝胶扫描仪扫描，记录电泳结果，或者照相记录。

h. 对寻找到的特异性标记带，可以用刀片割下，胶回收特异性片段，作为模板，用原来的引物进行 PCR 扩增，即可得到特异的目的 DNA 标记。

（5）数据分析：采用合适的统计软件，进行聚类分析，或者进行遗传作图。

方案 3　丝状真菌的 cDNA-AFLP

试剂与仪器：同方案 2。

方法与步骤：

1. 合成双链 cDNA 并纯化 DNA 片段　一般采用生物公司的试剂盒来完成，许多公司都有，这里用 Takara 公司的 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 完成。

（1）cDNA 第一链的合成：采用 20μl 体系。

1）在 200μl 的 PCR 管中配制表 1-5 反应液。

表 1-5　配制反应液

组分	体积(μl)	组分	体积(μl)
RNA	2(1μg/μl)	寡聚胸腺嘧啶核苷酸	1
5×第 1 链合成缓冲液	4	反转录酶(M—MLV)(200U/μl)	2
4 种脱氧核苷酸混合液（10 mmol/L）	1	DEPC ddH_2O	加至 20

2）用移液吸头轻柔搅拌混匀。

3）室温放置 10 min。

4）移至 42℃恒温水浴锅中，或者用 PCR 仪控温，反应 lh。

5）反应结束后置于冰上 2min。

（2）cDNA 第二链的合成及其末端平钝化

1）在第一条 cDNA 链合成后，在原管中按表 1-6 顺序加入合成 cDNA 第二条链的反应液。

表 1-6 第二链合成

组分	体积(μl)	组分	体积(μl)
cDNA 第一条链的反应液	20	*E. coli* DNA 聚合酶 I	2
5×第 2 链合成缓冲液	30	*E. coli* RNase H	2
4 种脱氧核苷酸混合液(10 mmol/L)	3	总体积	146
RNase-free ddH_2O	89		

2) 16℃反应 2h。

3) 70℃热处理 10 min,然后置于冰上。

4) 加入 4μl T4 DNA 聚合酶,移液吸头轻轻缓慢搅拌混匀。

5) 37℃反应 10min。

6) 加入 15μl 的 0.25mol/L EDTA (pH8.0), 15μl10%SDS 溶液,混匀以停止反应。

(3) cDNA 的纯化

1) 合成反应停止后,将反应液转移到一个 1.5ml 的离心管中,加入等体积(180μl)的酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1),溶液。

2) 剧烈振荡混匀。

3) 室温下 12 000 r/min 离心 5 min,液相分为 2 层,小心取出上层水相,转移至新的 1.5ml 离心管中。

4) 加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc。

5) 加入 2.5 倍体积的无水乙醇,充分混匀。

6) 4℃或冰上放置 10 min。

7) 4℃条件下 12 000 r/min 离心 15 min,去上清液。

8) 70%乙醇溶液清洗沉淀 2 次。

9) 在无菌操作台上干燥 5 min。

10) 加入 50μl 的 TE 溶解。

11) 置于—20℃保存

2. cDNA 的酶切处理 cDNA-AFLP 分析中也是用 2 个限制性内切酶组合 *Eco*R Ⅰ和 *Mse* Ⅰ处理样品。*Eco*R Ⅰ的识别位点为 6 个碱基,*Mse* Ⅰ的识别位点为 4 个碱基。由于 cDNA 经过纯化,酶切的时间可以比基因组 AFLP 的酶切时间要短。

在 PCR 管中,按表 1-7 所示的量加入各个反应成分:

表 1-7 酶切

组分	体积(μl)	组分	体积(μl)
10×缓冲液 R*	4	*Eco*R I (10 U/μl)	0.5
cDNA	10	ddH_2O	25
Mse I (10 U/μl)	0.5	总体积	40

* 限制性内切酶选用 Fermentas 公司的产品。

如果是其他公司的产品,选用公司推荐的合适缓冲液

加好后轻轻混匀,瞬时离心后,在 PCR 仪上进行酶切反应,反应程序为 37℃ 4h, 65℃ 15 min, 80℃10min。反应后立即置于冰上,或者于—20℃保存备用。

3. cDNA-AFLP 分析所需的引物和接头的设计合成

(1) 酶切产物与接头的连接:在 PCR 管中,按表 1-8 所示的连接体系加入各个组分。

表 1-8　酶切接头

组分	体积(μl)	组分	体积(μl)
cDNA 酶切产物	40	T4 DNA 连接酶(5U/μl)	1
*Eco*R I 接头(5pmol/μl)	2	T4 DNA 连接缓冲液	5
Mse I 接头(50pmol/μl)	2	总体积	50

轻轻混匀后,16℃连接过夜,然后于 70℃处理 20min 使酶失活,然后于－20℃保存备用。

(2) cDNA-AFLP 的预扩增(参见 AFLP 试验方案)。

(3) cDNA-AFLP 的选择性扩增(正式扩增)(参见 AFLP 试验方案)。

(4) cDNA-AFLP 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(参见 AFLP 试验方案)。

8　变性梯度凝胶电泳(DGGE)

核酸如 DNA 和 RNA,其结构在不同的温度或变性剂浓度下发生变化,梯度电泳是一类根据核酸高级结构进行分离的电泳方法,主要有变性梯度电泳(DGGE)和温度梯度电泳(TGGE),原理基本相同,最初的方法是变性梯度电泳(DGGE),由美国纽约州立大学教授 Leonard Lerman 发明。这种装置也可以用于分析蛋白质,电泳的图谱也相似,但原理不同。相对来讲,TGGE 的原理更容易理解。Lerman 和 Andersen 首先应用氧化铍盘制作了 TGGE 的装置,以后乔治亚技术公司的 Roger Wartell 完善,最终在德国定型。DGGE 装置的生产厂家有 Bio-Rad、INGENY 及 CBS 科技公司,TGGE 装置的生产厂家有 Biometra。

TGGE 的基本原理:室温下在含有 1mmol/L 以上的盐离子的溶液中,DNA 是呈线性双链螺旋的稳定结构,分子带负电荷,在电场中向正极移动。凝胶是含有筛孔的固相支持物,在标准电场中,DNA 线性分子要通过凝胶的筛孔,移动的速度与分子的大小相关,经过一定时间的电泳,不同大小的分子在电场中的位置不同,从而把不同的 DNA 分子分离。当温度升高,双链的 DNA 分子开始解链,也就是熔解。在高温下,2 条链可以完全分开;但在中等温度下,只有部分的双链解开,于是一个 DNA 分子就形成了一部分是双链,另一部分是单链的情况,就像一根绳子一端的部分已经分开,而另一端还是完好的。于是,1 个分子就形成了 3 个末端。如果是两端解开而中间还是双螺旋,就形成了 4 个末端,或者中间解开就形成带环的螺旋结构。这些部分熔解结构一旦形成,将对迁移率产生很大影响,移动速度迅速下降。更重要的是,凝胶中的实际温度还受到 DNA 分子序列的影响。这样,TGGE 提供了一个依赖序列而不依赖长度的 DNA 分离方法。最简单的比喻是,当一个人在拥挤的房间里移动时,如果伸直胳膊,虽然房间的拥挤度没有变化,但移动速度将急剧下降。

变性梯度凝胶(DGGE)的工作原理是电泳过程中提供了一个包含变性剂的电泳环境。研究发现,变性梯度凝胶中,DNA 能够形成各种状态的熔解结构,情形与 TGGE 相似。结果是 DNA 可以因为 1 个碱基的不同而被分离,即使 DNA 分子比较小(＜200～700bp)。随着变性条件的升高,DNA 分子可以逐渐变性,直至形成 2 条单链,即提供了一个像在活体细

胞内的 DNA 变性过程。由于 DNA 在变性梯度凝胶中的这种变性特性，研究者可以分析 DNA 序列上的不同，或者各种各样的基因突变。在双链 DNA 分子中，4 种碱基之间的结合力不同，G、C 碱基之间形成 3 个氢键，而 A、T 碱基之间形成 2 个氢键。因此，A、T 碱基对变性剂的敏感性要高于 G、C 碱基对。不同序列的双链 DNA 碱基组成和排列不同，在变性梯度电泳时，低 G+C 含量的片段在凝胶中变性而移动速度慢。因此，不同的 DNA 片段在电泳过程中产生不同带型。

分子大小一致但序列不同的 DNA 分子在梯度凝胶中电泳时，在不同的位置部分变性发生的程度不同，于是将在不同的位置停止移动。因而，将具有序列多态性的片段在同一变性梯度凝胶中电泳时，就可以检测微小的突变。当 2 个样品并列电泳时，DNA 片段上最小的不同(1 个碱基)也可以很容易地检测到。虽然 DGGE 技术还需要其他的多个步骤，如电泳前需要富集，电泳后可以对特异性 DNA 片段进行胶回收和扩增，但是 DGGE 技术提供了其他技术无法达到的优越性。

不同的染色方法对检测结果也有重要影响。其中，银染的灵敏度高，操作方便，成本低廉，成为变性梯度电泳染色的主要方法。

方案 4　土壤中真菌的 DGGE 分析

试剂：

1. 9%丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺溶液　丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺储备液用 0.5×TAE 缓冲液稀释而成。

2. 100%丙烯酰胺/ UF 溶液　9%丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺溶液中加入 42% (*W*/*V*)尿素和 40% (*V*/*V*)去离子的甲酰胺。

3. APS　10% APS。

4. 电泳系统　DCODE-system，Bio-Rad 公司。

5. 乙醇。

6. 染色液　按照以下浓度配制银染试剂。

(1) 固定液：1.8L 中加入 200ml 冰醋酸。

(2) 染色液：在 2L ddH_2O 中加入 2g $AgNO_3$ 和 3ml 甲醛。

(3) 显色液：60g Na_2CO_3 溶于 2L ddH_2O 中，冰浴至 10℃，使用前加入 37%甲醛 3ml 和 10mg/ml $Na_2S_2O_3$ 400μl。

(4) EB(溴化乙锭)染色液：0.5L 水中加入 50μl 10 mg/ml 溴化乙锭。

7. 甲酰胺　去离子化。

(1) 在 100 ml 的 100%甲酰胺中加入 5g 离子交换剂。

(2) 搅动 2h 以上。

(3) 用 1 号 Whatman 滤纸过滤 2 次。

(4) 分装成小份，每份 1ml。

(5) 于−20°C 储存。

8. 6×上样缓冲液　25mg 溴酚蓝和 2.5g ficoll 用 10 ml 的 1.0 mmol/L EDTA (pH8.0)溶解。

9. 浓缩胶　9%丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺溶液 5ml，70μl 10% APS 和 3.5μl TEMED

混合。

10. 电泳缓冲液　0.5×TAE 缓冲液。TAE 缓冲液：40mmol/L Tris-HCl，40mmol/L 醋酸钠，1mmol/L EDTA，pH 7.4。

11. TEMED。

方法与步骤：

1. 凝胶准备

(1) 用约 7L 的电泳缓冲液将电泳槽装满，将 DGGE 系统(DCODE-system)的盖子盖上，接通电源，将温度设置到 58°C。

(2) 将洗涤干净的干燥梯度混合器放在一个磁力搅拌器上，确保连接管和混合器室的连接是完好并处于关闭状态。

注意：高水平的梯度混合器非常重要，高度要达到 32cm。不同的高度对梯度的形成有重要影响。公司原配的混合器的混合结果一般比非原配的要好。Bio-Rad 的梯度混合器是内径 2 cm 的圆柱体形。

(3) 将制胶架的制胶腔和玻璃板洗净，然后用乙醇漂洗，晾干。

(4) 将制胶装置装好，放置在水平制胶器上。

(5) 在 1.0 ml 9%丙烯酰胺溶液中加入 25μl 10% APS 和 1.5μl TEMED，混合后倒入制胶槽中。

注意：为防止梯度凝胶制备时漏胶，先要形成一个胶栓。

(6) 制备梯度凝胶：现配制 12 ml 的 2 种目的丙烯酰胺/ UF 混合溶液。例如，要配制 15%～55% UF-梯度，需要配制：

1) 15%混合液：100%丙烯酰胺/ UF 溶液 1.8ml，9%丙烯酰胺溶液 10.2 ml。

2) 55%混合液：100%丙烯酰胺/ UF 溶液 6.6ml，9%丙烯酰胺溶液 5.4ml。

注意：梯度范围由分离片段的特性决定，凝胶一般用 20%～60%或者 35%～75%的梯度。80% 变性胶是 7mol/L 尿素加 32% 甲酰胺。

(7) 在每种混合液中加入 65μl 10% APS 和 3.3μl TEMED，轻柔混合，将低百分比的混合液装到梯度混合器的左侧圆筒中。轻轻打开连接阀，调整大小至几滴液滴进入另一个圆筒中。用高百分比的混合液装到梯度混合器的右侧圆筒中，打开磁力搅拌器。打开连接阀，制胶槽将慢慢装满。

注意：从凝胶固化的时刻开始，至少要放置聚合 1 h。

(8) 从凝胶顶部倒掉溢出的液体。

(9) 准备浓缩胶溶液，小心地将浓缩胶溶液加到梯度胶的顶部，然后插上凝胶梳子。浓缩胶聚合约 15min。

2. 上样和电泳

(1) 将凝胶梳子小心地拔出，用水冲洗上样孔。

(2) 关掉 DGGE 系统(DCODE-system)，打开盖子，放到旁边。

(3) 将制好的胶板放置到系统中固定，然后放到电泳槽中。

(4) 将上部的电泳槽中加满电泳液。

(5) 将 PCR 产物 15μl 与 6×上样缓冲液 3μl 混合。

(6) 用电泳缓冲液冲洗上样孔，小心地将样品加入。

(7) 将电泳系统的盖子盖好,打开开关,在 80 V 电泳 16 h。

3. 染色:银染或者 EB 染色。

(1) 银染操作步骤

1) 凝胶的固定:在固定专用水箱中入 3L 固定液,将凝胶取下,放入固定液中,置于摇床上 90 r/min 振荡 20min 或直至样品中染料完全消失,凝胶也可在固定液中不振荡保存过夜。

2) 洗胶:倒去固定液,用 ddH_2O 振荡洗胶,90 r/min 振荡 10min。从水中取出凝胶,竖直胶板静止 10～20s,使水流尽。

3) 凝胶染色:将凝胶转移至染色溶液 90 r/min 振荡 30min。

4) 洗胶:从染色溶液中取出胶板放入 ddH_2O 中浸洗 4s。

5) 显影:在 10℃预冷好的显影液中加入 37%甲醛 3ml 和 10mg/ml $Na_2S_2O_3$ 400μl,将洗后的凝胶立即放入显影液中,90 r/min 充分振荡,直至条带全部显现。

6) 固定凝胶:将固定液(10%醋酸溶液),直接倒入显影液中,固定 5min,终止显色。然后用 ddH_2O 漂洗 2min。

(2) EB 染色:将凝胶放入 EB 染色液中染色 30 min。

4. 拍照,分析。

9 重要的数据库和互联网资源

在互联网上有许多有关真菌基因型分析的数据库资源,表 1-9 列出了一些重要的网址。

表 1-9 真菌基因型分析中用到的重要网址

网址	描述
引物设计	
http://research.nwfsc.noaa.gov/protocols/olig-oTMcalc.html	决定引物溶解温度的基本计算及分子生物学操作技术
http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html	复杂计算并附有计算说明
http://dmg.nott.ac.uk/molbio/primer.html	根据蛋白质或 DNA 序列进行引物设计
引物资源	
http://www.botany.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htmr	DNA 的引物资源
http://plantbio.berkeley.edu/～bruns/primers.htmr	DNA 的引物资源
分子生物学技术	
http://molbio.info.nih.gov/molbio/desk.html	许多分子生物学链接
http://www.horizonpress.com/gateway	分子生物学、微生物学、生物化学互联网资源
http://www.nwfsc.noaa.gov/protocals.html	DNA,RNA 以及蛋白质的分析方法
基因组数据库	
http://rrna.uia.ac.be/	Rrna 网络资源
http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html	核糖体 数据库项目
http://www.genome.ad.jp/	基因组网络资源

续表

网址	描述
http://www. embl-heidelbeg. de/	EMBL 分子生物学实验室
www. ncbi. nih. gov	Genbank 基因组数据库和搜索引擎
系统发育分析	
http://evolution. Genetics. Washington. edu/phylip. html	Phylip 首页及系统发育分析软件链接
http://herbaria. harward. edu/treebase/index. html	系统学知识数据库
一般性数据库	
http://clue. genome. ad. jp/	遗传分析链接
http://www. ebi. ac. uk/biocat/	欧洲生物信息学研究所
http://iubio. bio. indiana. edu/	生物学数据库和分析软件
http://www. keil. ukans. edu/～fungi/	真菌资源-基础、链接、基因组测序计划

第二章　丝状真菌核酸的提取与分析

1　概述

能否从真菌细胞中提取到纯的、大量的 DNA 和 RNA 决定着丝状真菌分子生物学研究的进展速度。虽然科研人员已经想到了很多从真核细胞中提取基因组 DNA 和 RNA 的方法，许多提取纯化 DNA 和 RNA 的试剂盒也被相继开发出来，然而，很多提取纯化的方法还只适用于模式生物的细胞，比如酵母、果蝇和人类细胞。具体应用于丝状真菌的提取 DNA 和 RNA 的方法还不多，许多真菌的分子生物学研究难以深入进行，其中的重要原因就是不能获得高质量的 DNA 和 RNA。

本章提供了几种有效提取丝状真菌 DNA 和 RNA 的方法，通过这些方法获得的 DNA 可以用于酶切、琼脂糖凝胶电泳、Southern 印迹杂交，也可以用作聚合酶链反应(PCR)的模板及用于构建基因组 DNA 的噬菌体文库。RNA 可以用于 Northern 分析、RT-PCR 和 cDNA 文库的构建。这些方法针对不同的材料有所改变，但是可以应用于大多数实验室材料的研究。

2　基因组 DNA 的分离

真核细胞的 DNA 主要存在于细胞核中，与蛋白质结合构成大小不一的染色体。提取丝状真菌的基因组 DNA 首先要破碎细胞，使 DNA 释放出来，接着用化学的或者酶学的方法去除蛋白质、RNA 以及其他的大分子。丝状真菌的细胞壁含有复杂的多糖物质，菌丝通常产生色素，因此常常导致制备的染色体 DNA 样品中不同程度地带有少量的多糖/色素以及成分不同的胞壁物质。这些物质的存在会影响染色体 DNA 的限制性内切酶酶切，连接以及 PCR 反应的进行。目前使用的真菌染色体 DNA 的提取方法大体相似，差别主要在细胞壁的破碎方法。常用的破壁方法有冷冻/干燥菌丝研磨法，酶解形成原生质体法，玻璃珠机械破壁法及氯化苄法等。然后，以含高浓度 EDTA 的 SDS 溶液破裂细胞膜，再以酚/氯仿/异戊醇抽提去除蛋白，用乙醇沉淀 DNA。为了得到高质量的 DNA 样品，还要进一步地进行超速离心或柱色谱等处理。

2.1　CTAB 法提取真菌基因组 DNA

从丝状真菌中提取高质量的核酸，经常会遇到样品中有大量多糖存在的问题，影响核酸的产量和后续的酶学操作。CTAB 被广泛应用于制备纯化 DNA。CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)是一种阳离子去污剂，具有从低离子强度的溶液中沉淀核酸和酸性多聚糖的特性。在这种条件下，蛋白质和多糖仍留在溶液里。在高离子强度的溶液里，CTAB 与蛋白质和多糖形成复合物，不能沉淀核酸。因此，在高离子强度(>0.7mol/L NaCl)条件下，用 CTAB 处理破碎的真菌细胞，使 DNA 释放到溶液中，经过连续的酚和氯仿抽提去除

CTAB/多糖/蛋白质复合物，用异丙醇/无水乙醇沉淀上清液即可获得基因组 DNA。这种方法(方案 1)已经在我们实验室广泛应用，已经成功地提取了很多真菌的基因组 DNA，例如，稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)、镰刀菌(*Fusarium alternaria*)、毛壳菌(*Chaetomium globosum*)、绿色木霉菌(*Trichoderma viride*)。

方案 1　CTAB 法提取真菌基因组 DNA

试剂：

1. CATB 抽提缓冲液(500ml)

CTAB	2%	10g
Tris 碱	100mmol/L	6.06g
EDTA	10mmol/L	1.46g
NaCl	0.7mol/L	20.5g

2. CIA　氯仿/异戊醇 24∶1(*V*/*V*)。

注：CTAB-Hexadecytrimethylammonium Bromide(Sigma # H-5882)(非离子型去污剂，十六烷基三甲基溴化铵)

方法与步骤：

1. 把菌丝样品放入盛有 10～20ml 液氮的碾钵中，快速碾磨，使菌丝碾成粉末。

2. 把菌丝粉末移入 50ml 离心管中，加入 4ml 65℃ CTAB 抽提液，混匀，盖上盖，65℃温育 30min，每隔 10min 颠倒混匀一次。

3. 加 3～4ml CIA，开盖，在通风柜中放 1～2min(放气)。

4. 盖盖，在摇床上轻轻混合 15～20min。

5. 4 000～5 000r/min，4℃，离心 5min。

6. 仔细回收水(上)相于离心管中。水相再用 CIA 重复抽提 1 次。

7. 在水相中加入等体积的异丙醇，轻轻颠倒混匀数次。

8. 静置 5min，沉淀核酸。

9. 10 000r/min，4℃，离心 10min(斜角离心)。

10. 轻轻倒出上清液，将离心管倒扣在滤纸上排干水分，约 5min。

11. 用 300μl ddH_2O 重悬沉淀。

12. 移入 eppendorf 离心管中，用 1/10 体积的 3mol/L 乙酸钠(NaAc)[或 7.5mol/L 乙酸铵 AmmAc(1/2 体积)]和 2 倍体积的无水乙醇重沉淀核酸。

13. －20℃静置 10min。13 000r/min，离心 20min。

14. 用 70%乙醇溶液洗 1 次，13 000r/min，室温，离心 5min。

15. 抽真空干燥，20～40min。

16. 用 25～100μl 的 TE ＋ RNase 重悬(室温，几小时)。注意：此时不能摇动，以免基因组 DNA 断裂。

2.2　氯化苄(benzyl chloride)法提取真菌基因组 DNA

氯化苄具有裂解和抽提两种功能，提取的 DNA 可用于 PCR 等研究(图 2-1)。

方案 2　氯化苄(benzyl chloride)法提取真菌基因组 DNA

试剂:

1. 0.5mol/L Tris-HCl(pH 9.0)　在 80ml 水中加入 6.055 三羟甲基氨基甲烷(Tris),溶解后用 1mol/L HCl 调 pH9.0,加水定容至 100ml,灭菌备用。

2. 0.5mol/L EDTA(pH 8.0)　在 80ml 水中加入 18.61g 乙二胺四乙酸二钠($Na_2 \cdot EDTA_2 \cdot 2H_2O$),用 NaOH(约 2g)调 pH8.0,加水定容至 100ml,灭菌备用。

3. 10% SDS(pH7.2)　在 90ml 水中加入 10g 电泳级十二烷基磺酸钠(SDS),加热至 68℃助溶,用 0.1mol/L NaOH 调 pH7.2,加水定容至 100ml,无须灭菌。

4. 3mol/L NaAc(pH5.2)　在 50ml 水中溶解 24.609g 无水乙酸钠(NaAc),用冰醋酸调 pH5.2,加水定容至 100ml,灭菌备用。

5. 提取液(100mmol/L Tris-HCl,pH9.0;40mmol/L EDTA,pH8.0)　在 60ml 水中加入 20ml 0.5mol/L Tris-HCl(pH9.0)和 8ml 0.5mol/L EDTA(pH8.0),加水定容至 100ml。

6. TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl,pH8.0;1mmol/L EDTA,pH8.0)　在 80ml 水中加入 2ml 0.5mol/L Tris-HCl(pH9.0)和 0.2ml 0.5mol/L EDTA(pH8.0),用 1mol/L HCl 调 pH8.0,加水定容至 100ml,灭菌后储存于 4℃冰箱中。

方法与步骤:

1. 1.5ml 离心管中加入已用液氮研磨的菌粉 100mg 和 500μl 提取液(100mmol/L Tris- HCl,pH9.0;40mmol/L EDTA,pH8.0),振荡使之充分混合(或涡旋 15～20s)。

2. 加入 100μl 10% SDS、300μl 氯化苄,剧烈振荡,使管内混合物呈乳状(或涡旋 30s)。

3. 50℃保温 1h,每隔 10min 振荡混匀 1 次。

4. 加入 300μl 预冷的 3mol/L NaAc(pH 5.2),混匀,冰浴 15min(或 4℃放置 20min)。

5. 11 000r/min 室温离心 15min 后取上清液。

6. 加入 650μl CIA,在摇床上轻轻混合 15～20min。11 000r/min 离心 15min 后取上清液。

7. 加入 700μl CIA,在摇床上轻轻混合 15～20min。11 000r/min 离心 15min 后取上清液。

8. 加入等体积异丙醇,颠倒混合,室温或 4℃静置 10min。

9. 12 000r/min 室温离心 10min,弃上清液。

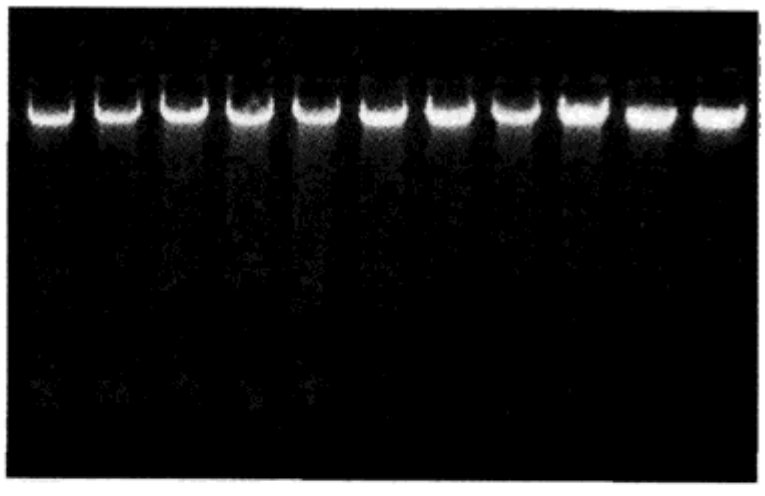


图 2-1　氯化苄法提取几种真菌基因组 DNA 的电泳

10. 沉淀用 500μl 70% 乙醇溶液洗 1 次,12 000r/min 离心 5min,晾干后溶于 200μl TE 中(室温静置 2～3h 或 4℃放置过夜)。

11. 加 RNase(10μg/μl)1μl,混匀,37℃保温 30min。

12. 加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc(pH 5.2)和 2 倍体积的无水乙醇,颠倒混合,－20℃放置 10min。

13. 12 000r/min 室温离心 10min,弃

上清液。

14. 沉淀用70%乙醇溶液洗1次，晾干后溶于50μl TE中(4℃放置过夜)。−20℃保存备用(图2-1)。

2.3　分离高分子量的DNA

双链DNA是非常惰性的化学物质，在化学上是稳定的，但是它在物理上是易碎的。高分子量的DNA，长而弯曲，仅具有轻微的侧向稳定性，因而容易受到轻微的流体剪切力的伤害。DNA分子越长，断裂剪切所需的力越弱。因此，基因组DNA容易成片段地获得，所需分析质量越大，获得的难度也相应增加。大于150kb的DNA分子易于被常规分离基因组DNA过程中产生的力切断。对于大多数的丝状真菌，普通的CTAB方法已经可以满足试验的需要，但是，对于基因组文库如cosmid文库的构建，需要更大分子质量的基因组DNA。

方案3　丝状真菌总DNA的分离

设备与试剂：

1. Dounce匀浆器，韦氏搅拌器—搅拌杯(−70℃预冷)，玻璃珠烧杯。

2. 洗涤Miracloth(一种半透膜)　将一定大小的Miracloth在ddH_2O中浸泡，折叠。用10mmol/L EDTA煮3次，再在ddH_2O中煮4次，冻干。放入70%乙醇溶液中4℃保存。

3. 酸洗涤玻璃珠(直径大小约为300μm)。

4. 10×SSE(按500ml配制)　10mmol/L亚精胺-HCl，1.0mol/L KCl，100mmol/L EDTA，100mmol/L Tris-HCl(pH 7.0)−20℃保存。

5. PMSF(氟磺酰甲苯)　100mmol/L PMSF，用95%乙醇溶液10ml溶解0.871g PMSF，−20℃保存。

6. 0.5×SSE(1L)　100ml的10×SSE盐，1ml β-巯基乙醇，10ml 100mmol/L PMSF(0.871g溶解于95%乙醇溶液中)，171.2g蔗糖，现配现用。

7. 4L ddH_2O 4℃预冷。

8. TNE　10mmol/L Tris-HCl pH 7.6，15mmol/L NaCl，1mmol/L EDTA。

9. 20%(W/V)十二烷基N-甲基甘氨酸(钠盐)　20g/100ml H_2O。

方法与步骤：

1. 从培养皿中取出4cm×4cm的菌丝块放入装有50ml真菌液体培养基中培养，并将其装在有10ml的搅拌器富集生长培养基中破碎，倒入250ml三角瓶中，加入约50ml培养基，振荡培养4～5天。将培养物搅碎然后分别接入4个装有500ml培养基的1L的三角瓶中。24℃振荡培养4～5天。仔细观察幼菌丝的生长情况，因为幼菌丝最容易提取DNA。

2. 用Miracloth过滤培养物，然后用冷ddH_2O仔细洗涤。用2层Miracloth轻轻挤压以便除去菌丝周围的多糖黏液。用吸水纸将包在Miracloth菌丝吸压，干燥到能直接取出为止。

3. 将菌丝放入烧杯中，置于冰上。缓慢加入0.5×SSE缓冲液，不断搅拌(用小铲或小勺)直至细胞不再吸收缓冲液为止，此时菌丝会聚集成一个个湿团。

4. 用小勺将菌丝球取出放入装有液氮研钵中(预冷至−70℃)使之结冰。快速研磨，将菌丝磨制成小块，−70℃保存备用。

5. 将韦氏搅拌器的不锈钢搅拌杯－70℃预冷并将菌丝小块转移至其中，快速研磨至粉末状。

6. 将粉末移至不锈钢容器中，使其融化，温度保持在0～4℃。不断搅拌，用温度计监控温度。

7. 将装有玻璃磁珠的磁力搅拌器在冰浴上预冷。加入融化的菌丝与预冷的玻璃磁珠(－20℃)混合至烧杯满为止。在磁力搅拌器周围用冰块包裹，快速搅拌3～4次，每次30s。在每次搅拌处理前后仔细观察爆裂程度。准备过程不能有任何完整的菌丝碎片。

8. 用2层Miracloth过滤，将玻璃磁珠用冰的0.5×SSE冲洗。将其体积加至250ml。用大约100ml 0.5×SSE冲洗。

9. 保留滤液6 000g离心20min。倒出上清液，沉淀小心移至Dounce匀浆器中。用DOUNCE小心重悬沉淀(40ml新配制的0.5×SSE)。

10. 轻轻倒出悬浮液至Oakridge管中后在吊桶式转头离心机中6 000g离心20min。加入30ml 0.5×SSE重悬沉淀再加到Dounce匀浆器中。重复1次。

11. 用Dounce匀浆器加入0.5×SSE冲洗，旋转和重悬2次。这次也含有0.2%(V/V)的Nonidet P40，用来溶解线粒体。

12. 用10ml 0.5×SSE重悬最终的沉淀(不要用移液枪)。加入20%十二烷基N-甲基甘氨酸使得最终浓度为1%，小心搅拌，使其温度升至室温。溶液很有黏性。

13. 加入蛋白激酶K(大约0.5g)37℃温育1h。

14. 室温条件下用1L 1×TNE透析。转移DNA预备物时要非常小心以避免断裂。每隔1～1.5h换1次透析液。细胞碎片将开始在透析管底部聚集。

15. 吊桶式转头离心机中4℃ 8 000g离心5min以将DNA样品于细胞碎片分开。弃沉淀。

16. 准备标准的氯化铯梯度溶液49%(W/W)。避免强光直接照射以防止DNA降解。47 000g离心过夜。

17. 在不直接的紫外线照射下用18号计量针抽取DNA条带。不必要的情况下不要增加抽取体积。用饱和的丁醇溶液提取EB(可能花费1天时间)。在此过程中用箔包住离心管并且放置在温和振动的平台上。

18. 透析DNA时换3次1×TNE。用分光光度计测量DNA的量。浓度在300～500ng/μl范围内为正常值。这个过程会得到5～10ml的DNA。

19. DNA可以用异丙醇浓缩，如果需要用真空离心蒸发浓缩器浓缩。

2.4 小量DNA的快速提取

对于通过PCR方法对大量的菌株进行检测时，快速而又不相互交叉污染的小量DNA提取方法非常重要。如要检测同源置换转化子，或者检测其他外源基因是否已经成功转入等。这里介绍2种从菌丝中快速提取DNA的方法，可用于大批量菌株的PCR。

方案4利用固体平板培养菌株，可以实现大批量菌株的DNA提取。Lee等在实验室中，用一个直径为9cm的平板上可以培养30个菌株(转化子)，用于小量DNA的提取。培养好菌落的平板在4℃的冰箱中存放2个月，还可以进行DAN的提取。方案5要液体培养，但质量相对较好，还可以用于RNA的提取。

方案 4　固体平板上菌小量 DNA 的快速提取(以稻瘟病菌为例)

试剂:

提取液缓冲液:(1mol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L EDTA);2-丙醇;80%乙醇溶液;TE 缓冲液。

设备:

小型手提电钻;研磨棒;1.5ml 离心管。

方法与步骤:

1. 准备菌株　将真菌菌株接种在合适的固体培养基平板上,于适宜条件下培养,至其菌落直径达到 1cm 左右。对于稻瘟病菌,在 CM 固体培养基上 25℃培养黑暗 2～3 天。

2. 准备反应管　准备 2 个系列的 1.5ml 离心管,第 1 系列中加入 0.5ml 提取缓冲液,第 2 系列中加入 0.3ml 2-丙醇。

3. 收集菌体　菌丝体或者孢子都可以用于提取。用牙签在菌落表面刮取 10～20μg 的菌体材料(稻瘟病菌约 20～40 mm^2 菌落面积),放入含有提取缓冲液的离心管中。

注意:少量的琼脂培养基不影响后续的提取反应。不要让菌体在提取缓冲液中存放很长时间,尽快进行后续操作,有助于提高 DNA 的质量。

4. 机械磨碎菌丝体　用小型的手提电钻研磨。将玻璃(或者塑料的)研磨棒代替电钻的钻头,装到电钻上固定。用电钻将菌体组织轻轻压入管底,按动开关,快速研磨 2s。不必将菌体研磨地很完全。

为了防止交叉污染,可以通过更换研磨棒的方式,或者研磨后,将带研磨棒的电钻插入 70%的乙醇溶液中,开动机器 2s,然后插入灭菌的蒸馏水中再开动 2s,即可用同一研磨棒处理下一样品。

注意:研磨时不要按地太用力,也不要研磨超过 5 s,以防发热太多造成离心管破坏。操作要注意安全,不能先开机器再插入离心管,不能没有关闭机器就将电钻离开离心管。

5. 去掉组织残片　将离心管放入离心机中 5 000r/min 离心 10min,直接将上清液转移到含有 0.3ml 2-丙醇的离心管中(在第 2 步中已经准备)。弃去组织残体。

注意:上清液中可能存在有少量残体的污染,但对 DNA 提取影响不大,不用去除。

6. 沉淀 DNA　将离心管上下颠倒几次以将提取液和 2-丙醇混匀。然后 12 000r/min 离心 10min,尽量去掉上清液,沉淀用 80%乙醇洗 2 次。

7. 溶解 DNA　将离心管放在 37℃下 15min 以蒸发掉残留的乙醇。然后在管中加入 50 μl 的 ddH_2O 或者 TE,再加入 RNA 酶(RNase A)至终浓度为 10 μg/ml,溶解 DNA。

方案 5　真菌小量 DNA 的快速提取

用这种方法一个人可以提取 100 个以上的样品。

试剂:

提取缓冲液配方:2% Triton X-100;1% SDS;100 mmol/L NaCl;10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0;1 mmol/L EDTA, pH 8.0。

方法与步骤:

1. 在 CM 培养基中加入 5g/L 的酵母提取物,配成 CMY 液体培养基。

2. 将 10^5 个真菌孢子加到含有 2ml CMY 液体培养基的试管中，合适温度下静止培养 16h。对于曲霉菌，培养温度为 37℃。

3. 过滤收集菌丝，将过滤后的滤纸夹在吸水纸中，吸干菌丝表面的水分。

4. 将菌丝转移到含有 0.5ml 提取缓冲液的 1.5ml 离心管中。

5. 将研磨棒安装在小型手提电钻上，用小型手提电钻研磨 2s。

6. 加入等体积的氯仿/异戊醇(氯仿：异戊醇=24：1)，快速振荡 1min。

7. 12 000r/min 离心 10min。

8. 上清液转入一个新的 1.5ml 离心管中，加入 2 倍体积预冷的无水乙醇，上下颠倒混匀数次。

9. 4℃或者室温条件下，12 000r/min 离心 10min，以沉淀 DNA。

10. 弃去上清液，加入 70%乙醇溶液洗 1 次。

11. 重复步骤 10 一次。

12. 在无菌操作台上开盖干燥 5min。

13. 加入 50 μl 的 ddH_2O(用 DEPC 处理的)或者 TE，再加入 RNA 酶(RNase A)至终浓度为 10 μg/ml，溶解 DNA。

14. 如果做 PCR，加 0.5～1 μl 作为模板。如果做酶切，用 5～10 μl 即可。

3 丝状真菌 RNA 的提取

要成功地提取真核生物的 RNA，关键在于尽可能完全抑制或去除 RNA 酶的活性。Trizol 是一种新型总 RNA 抽提试剂，内含异硫氰酸胍等物质，能迅速破碎细胞、抑制细胞释放出的核酸酶。细胞在变性剂异硫氰酸胍作用下被裂解，同时核糖体上的蛋白变性，核酸释放。释放出来的 DNA 和 RNA 由于在特定 pH 下溶解的不同，而分别位于整个体系的中间相和水相，从而得以分离，经过有机溶剂抽提、沉淀，得到纯净 RNA。

4 RNA 的操作

分离制备的 RNA 的质量可以通过紫外吸收值或凝胶电泳检测。纯 RNA 的 $OD_{260}/OD_{280}=2.0$，由于材料和方法的不同，一般纯化的 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.7～2.0，若低于此值，则样品中可能有蛋白质污染，可以用酚/氯仿抽提去除(抽提后 RNA 会有损失)。

用甲醛变性凝胶电泳可以分析 RNA 的长度和相对含量。如电泳发现 RNA 降解较多，则表明在制备 RNA 的过程中污染有 RNA 酶活性，应该使用各种 RNA 酶抑制剂，减少 RNA 酶污染。要注意，RNA 酶在许多抑制剂存在的情况下，只是暂时失活，一旦抑制剂去除，则有可能恢复活性。

在分子生物学试验中，常采用 Northern 印迹技术和具有更强灵敏度的核酸酶保护分析法定量检测基因表达的差异。在 Northern 印迹技术和具有更强灵敏度的核酸酶保护分析中，杂交信号的强弱与样品中目的 RNA 的量成正比。在样品量有限，或者目标信号太少的情况下，反转录酶 PCR(RT-PCR)方法显示出优越性。RT-PCR 的原理：提取组织或细胞中的总 RNA，以其中的 mRNA 作为模板，采用 Oligo(dT)或随机引物利用反转录酶反转录成 cDNA。再以

cDNA 为模板进行 PCR 扩增，而获得目的基因或检测基因表达。RT-PCR 使 RNA 检测的灵敏性提高了几个数量级，使一些极为微量 RNA 样品分析成为可能。该技术可以用于分析基因的转录产物、获取目的基因、合成 cDNA 探针、构建 RNA 高效转录系统。

方案 6　Trizol 法提取丝状真菌总 RNA

试剂：Trizol。

方法与步骤：

1. 丝状真菌菌丝、孢子或附着胞的收集和研磨（约 1g）。

2. 在 1.5ml 离心管中加入 1ml Trizol，室温放置 5min，使其充分裂解。

3. 8 500r/min 离心 5min，弃沉淀。

4. 按 200μl 氯仿/ml Trizol 加入氯仿，振荡混匀 15s，室温放置 3min。（不能用涡旋振荡器，以免基因组 DNA 断裂）

5. 4℃ 8 500r/min 离心 15min。

6. 吸取上层水相，转移至另一离心管中。

7. 按 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 加入异丙醇混匀，室温放置 10min。

8. 4℃ 8 500r/min 离心 10min，弃上清液，RNA 沉于管底。

9. 按 1ml 75%乙醇溶液/ml Trizol 加入 75%乙醇溶液，温和振荡离心管，悬浮沉淀。

10. 4℃ 6 500r/min 离心 5min，尽量弃净上清液。

11. 冰上晾干 10min。

12. 用适量 DEPC-H_2O（约 100μl）溶解 RNA 样品。

方案 7　丝状真菌总 RNA 的提取

试剂：

1. 提取缓冲液（100ml）　4.8g PAS（p-aminosalicylic acid，sodium salt；Sigma），0.8g TNS（tri-isopropylnaphthalene sulfonic acid，sodium salt；Eastman-Kodak），分别溶解 2 种药品于 40ml 水中，然后将 PAS 加入 TNS 中，不断搅拌。

2. TELS　10mmol/L Tris-HCl PH 7.6，0.1mmol/L EDTA，0.2% SDS。

3. 5×RNB　1.0mol/L Tris 碱，1.25mol/L NaCl，0.25mol/L EDTA。用 NaOH 调节 pH8.5，−20℃保存。加入 20ml 5×RNB 到 PAS-TNS 的混合液中（PAS=4.8%，TNS=0.8%），出现浅褐色沉淀，不会影响缓冲液的使用。将溶液放在冰上，现配现用。

方法与步骤：

1. 收集菌丝，将菌丝在液氮中磨成粉状。

2. 将磨好的菌丝放入 50ml 离心管中，加入 4ml 提取缓冲液和 4ml 酚/氯仿，振荡 5min，冰上放置 30s。

3. 4℃，9 650g 离心 10min。将水相转移到新的离心管中，置于冰上。

4. 加入 5ml 提取缓冲液于酚/氯仿的表面，混匀，68℃加热 5min，冰上冷却，离心（同 3），将水相转移到上一步盛有水相的离心管中，混合 2 次的水相，置于冰上。

5. 重新提取水相，直到酚/氯仿界面没有分层。

6. 缓慢加入 0.25 倍体积的 10mol/L LiCl（终浓度 2mol/L），冰上放过夜。4℃，9 650g

离心 15min。

7. 用 5ml 0.1mol/L 乙酸钠 pH6.0/70%乙醇溶液悬浮沉淀，4℃，9 650g 离心 20min。

8. 重复步骤 7 一次。

9. 50μl TELS 悬浮沉淀。如果 RNA 用来构建 cDNA 文库，将沉淀用 DEPC 处理过的 ddH_2O 悬浮。

方案 8　真菌总 RNA 的小量提取(Trizol 法)

方法与步骤：

1. 在 CM 培养基中加入 5g/L 的酵母提取物，配成 CMY 液体培养基。

2. 将 10^5 个真菌孢子加到含有 2ml CMY 液体培养基的试管中，合适温度下静止培养 16h。对于曲霉菌，培养温度为 37℃。

3. 过滤收集菌丝，将过滤后的滤纸夹在吸水纸中，吸干菌丝表面的水分。

4. 将菌丝转移到含有 0.5ml Trizol 提取缓冲液的 1.5ml 离心管中。

5. 将研磨棒安装在小型手提电钻上，用小型手提电钻研磨 2s。

6. 再加入 0.5ml Trizol 提取缓冲液，室温放置 2～5min。

7. 加入 0.2 倍体积的氯仿/异戊醇(氯仿：异戊醇＝24：1)，剧烈振荡 1min；室温放置 2min。

8. 在 4℃用 12000r/min 离心 10min。

9. 上清液转入一个新的 1.5ml 离心管中，加入 1 倍体积的异丙醇，上下颠倒混匀数次。室温放置 10min。

10. 4℃或者室温条件下，12 000r/min 离心 10min，以沉淀 RNA。

11. 弃去上清液，加入 70%乙醇溶液(用 DEPC 处理的 ddH_2O 配制)洗 1 次。

12. 重复步骤 11 一次。

13. 在无菌操作台上开盖干燥 2～5min，不要很干燥。

14. 加入 50 μl 的 ddH_2O(用 DEPC 处理的)或者 TE(用 DEPC 处理的 ddH_2O 配制)，溶解 RNA，储存在－80℃。

第三章　丝状真菌的 DNA 转化

1　概述

各种从植物病原真菌中分离与致病相关基因技术的迅速发展，促进了人们对病原真菌致病机理的研究。在酵母、粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)和构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)转化系统的建立以后，丝状真菌遗传转化系统研究进展迅速，据不完全统计，到目前为止已经在 100 多种丝状真菌中成功地进行了转化试验。丝状真菌遗传转化系统的建立为人们从基因水平研究丝状真菌的遗传背景和进一步的菌株改造提供了条件，通过转化把外源基因导入丝状真菌细胞，利用基因互补、基因破坏和基因替换等原理克隆或表达目的基因、分析基因的表达调控机制乃至改造工业生产菌株。本一章节主要介绍应用于病原真菌中的几种技术，也可以成为其他真菌研究的有效方法。大多数的丝状真菌的转化依赖于 $CaCl_2$-PEG 介导的原生质体转化，或者是电击转化。这两种方法在转化前都要求预先制备原生质体或者渗透敏感细胞。大多数植物病原真菌都可以利用聚乙二醇(PEG)或电转化法进行转化，但是对于有些真菌，其原生质体难以制备或者只能够活体寄生，因此，很难利用上述方法转化。对于这样的真菌所采用的转化方法是基因枪转化或农杆菌介导转化方法。

2　选择性标记和转化载体

2.1　选择性标记

遗传转化通常是稀有事件，因此从大量的未转化细胞(原生质体)背景中筛选转化子必须依赖于可供选择转化子的遗传标记。丝状真菌的转化载体一般都是以细菌来源的质粒为基础构建的载体。由于这些载体要在原核细胞和真核细胞中扩增乃至表达目的基因，为便于基因操作常把一些选择性标记基因构建在载体上。常见的选择性标记主要有三类：①营养缺陷型标记基因，通过转入的标记基因与受体细胞突变基因互补，使受体细胞表现野生型生长；②药物抗性标记基因，基因的转入可以使受体细胞在一定的药物浓度下生长，表现出药物抗性；③标记基因具有与受体细胞染色体同源的序列，可以插入受体细胞染色体上的特定位点，从而破坏该位点附近基因的表达而产生突变表型。

2.1.1　营养缺陷型标记

最初转化的丝状真菌多是利用营养缺陷型菌株而进行的，通过将野生型等位基因转移到相应的营养缺陷型菌株中，在基本培养基中筛选原养型生长菌落而得到转化子。常被用作丝状真菌转化的选择性标记基因有：来自 *N. crassa* 的编码乳清酸核苷-5′-磷酸脱羧酶的 *pyr*-4 基因，编码色氨酸生物合成酶的 *trp*-1 基因，编码 NADP 特异性谷氨酸脱氢酶的 *am*

基因;来自 *A. nidulans* 编码乙酰胺酶的 *amds* 基因,类似于 *Meurospora trp*-1 基因的 *trpC* 基因,编码鸟氨酸氨甲酰基转移酶的 *argB* 基因,类似于 *Neurospora* 的 *pyr*-4 的 *pyrG* 基因,编码硝酸盐还原酶的 *niaD* 基因;来自 *A. niger* 和 *Penicillium chrysogenum* 的 *trpC* 基因;来自 *A. oryzae* 和 *P. chrysogenum* 的 *pyrG* 基因。以上这些选择性标记可以用于不同种丝状真菌之间的转化,因此只要有合适的营养缺陷型受体菌,寻找一种较好的营养缺陷型标记是完全可能的。

2.1.2 药物抗性标记

在大多数丝状真菌中难以获得适宜的营养缺陷型菌株,并且高产菌株中的任何正向突变均具有无法控制的副作用,并最终降低产量,这自然妨碍了利用遗传工程改良菌株,限制了这一选择性标记的应用范围。因此,利用不需要相应突变型菌株的显性标记(药物或抗生素抗性)进行遗传转化尤为重要。

目前常用的药物抗性标记有:来自 *N. crassa* 的编码苯菌灵抗性的 *Bml* 基因;来自 *A. niger* 的编码寡霉素抗性的 *oliC* 基因;另外还有来自细菌的潮霉素抗性基因($HygB^r$),博来霉素抗性基因,G418 抗性基因(Neo^r),腐草霉素抗性基因以及氨基糖苷类,大环内酯类,金属糖肽类抗生素抗性基因等。

2.1.3 致突型或建立特殊代谢途径的标记

通常携带有受体菌基因片段的质粒可以通过同源重组整合到受体菌的染色体上,造成染色体上部分基因功能的缺失,从而产生突变。以此作为选择性标记已经被用于丝状真菌的转化试验中。如携带有 *A. nidulans* 的 *pryG* 基因的部分片段的质粒,转化 *A. nidulans* 可以造成乳清酸核苷-5′-磷酸脱羧酶功能的缺失。因此,转化子可以通过 5-氟乳清酸抗性进行选择。另外,在 *A. nidulans* 的转化中还使用了可以破坏目的基因(*yA* 和 *wA*)功能的选择性标记。也可采用建立特殊代谢途径的方法:如利用来自 *A. nidulans* 的 *amdS* 基因,在以乙酰胺为唯一氮源的培养基上筛选转化子。

2.1.4 共转化

当受体细胞与不同的基因片段同时混合时,细胞在很大程度上会同时吸收这些基因片段,此现象即为共转化。因此,当转化基因不易被直接检测时可以把它与一个易于检测的选择性标记进行共转化。1985 年,Wernars 等在 *A. nidulans* 中成功地进行了共转化试验。1987 年,Penttila 等通过实验证明:用无选择性标记的 DNA 与具选择性标记的质粒 DNA 进行共转化时,其共转化频率可高达 80%。

2.2 转化载体

丝状真菌的转化载体通常有两种:自主复制型载体和整合型载体。前者的转化 DNA 进入寄主细胞后,可独立存在于寄主细胞核染色体外,不与寄主染色体整合,此种载体上带有真核系统特异的复制起点,因此,可以在受体细胞中自主复制形成多拷贝。但是,这种载体不稳定,在没有选择压力的条件下容易丢失。后者在寄主细胞内不能单独存在,它必须与寄主染色体整合,随着细胞分裂而平均分配到子代细胞中,随寄主染色体一道复制。因

此，整合型载体要比自主复制型载体稳定的多。

自主复制型载体多存在于细菌和酵母中，在丝状真菌中发现的不多，仅有几例，且多存在于线粒体中。酵母的自主复制型载体通常含有 2μ 质粒序列，它可以使载体稳定存在于宿主细胞中。令人遗憾的是酵母 2μ 序列在丝状真菌中不能发挥作用。但可以考虑利用丝状真菌的线粒体质粒构建自主复制型载体。

目前，丝状真菌的转化大多为整合型转化，因此，整合型载体在丝状真菌转化中占有极其重要的地位。整合型载体主要通过同源重组和非同源重组两种方式整合到丝状真菌的染色体上。Southern 印迹杂交表明，同源重组产生 2 种类型的转化子，一种是载体 DNA 与染色体 DNA 发生单交换，导致目的基因与染色体基因的连锁。另一种是载体 DNA 与染色体 DNA 发生双交换，其结果是致使染色体基因被目的基因所取代，即发生了基因取代现象。非同源重组常产生多位点多拷贝整合的转化子，目的基因在染色体上形成不连锁的重复。若要鉴定转化 DNA 与同源染色体的特异位点是否连锁，可通过转化子与野生型杂交，分析杂交子代。当整合 DNA 与同源位点紧密连锁时，杂交子代中缺乏或以非常低的频率出现非转化的突变型，而非紧密连锁可得到 25%的这种突变型。丝状真菌的转化多数为同源整合，但是非同源整合也占有一定的比例，两者的比例与受体菌和转化载体有关。

3　待转化 DNA 的质量

一般来说，用于丝状真菌转化的 DNA 质量要好，我们习惯于用氯化铯梯度纯化 DNA 或者是商业提供的 DNA 制备试剂盒，例如，Qiagen DNA 纯化试剂盒。普通碱法裂解获得的 DNA 不能够满足转化的需要。

4　DNA 的进入

DNA 以很多形式进入真菌。真菌的细胞壁阻碍外源 DNA 的摄入，必须去除真菌的细胞壁或者是通过电击、粒子束技术使外源 DNA 进入，或者用农杆菌介导的方法。传统的方法依赖于 PEG 介导使真菌摄入外源 DNA，现在又有很多新的方法，以下分别予以介绍。

4.1　原生质体的形成

4.1.1　真菌细胞壁的消解

原生质体技术可以利用原生质体无壁的特点，直接摄取外源 DNA 或细胞器，又能与异种原生质体融合而创造新的体细胞杂种，大大地提高了育种效率。原生质体是除去细胞壁的真菌细胞，但仍保持完整细胞的遗传特性及生理、生化特性，在适当的条件下仍能再生细胞壁，并恢复成完整细胞。真菌细胞由结实的细胞壁包围，细胞壁的主要成分为己糖或氨基己糖构成的多糖，如几丁质、脱己酰几丁质、纤维素、葡聚糖等，此外还有蛋白质、无机盐等。各真菌类群间细胞壁成分差异很大，根据真菌细胞壁成分，通常采用相应的酶来裂解细胞壁制备原生质体，目前酶解真菌细胞壁效果较好的酶有 Novozyme234 和真菌溶壁酶 Lywallzyme，均为木霉菌中提取的混合酶，采用单一酶或者与其他酶结合使用，如 drislase、蜗牛酶和纤维素酶等，来制备符合转化需要的原生质体(图 3-1)。

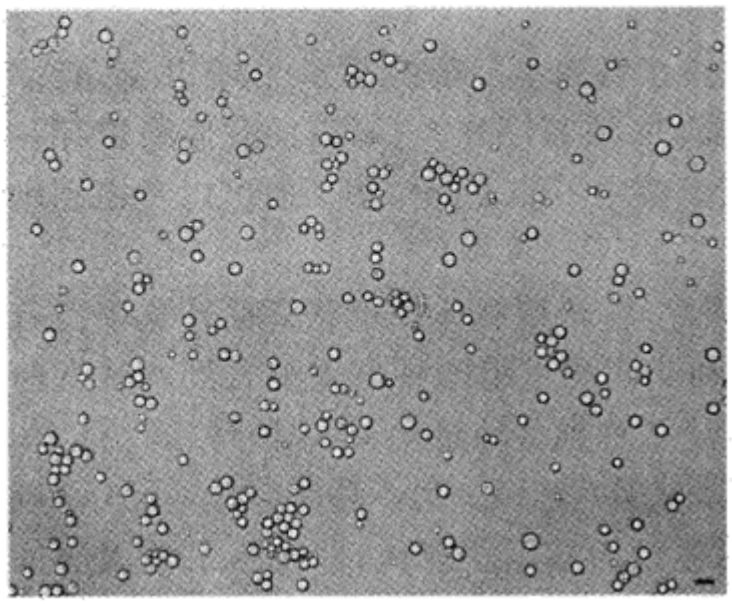


图 3-1 稻瘟病菌原生质体

4.1.2 原生质体的渗透压

原生质体的制备一定要在渗透压稳渗剂中进行，稳渗剂包括无机盐类和有机糖醇类，如 0.5～0.7mol/L KCl、$MgCl_2$、$(NH_4)_2SO_4$、蔗糖，0.8～1mol/L 山梨醇或甘露醇等，其中以山梨醇最为常用。根据资料显示，不同的丝状真菌原生质体的最佳制备条件各有不同，如指状青霉原生质体的制备，采用 1%溶壁酶和 1.5%蜗牛酶，以 0.7mol/L NaCl 作为稳渗剂；而稻瘟病菌则采用 0.75% Glucanex，以 0.7mol/L NaCl 作为稳渗剂。

4.1.3 起始材料

菌龄、酶解时间、温度等因素对原生质体的制备均有重要影响，通常采用幼嫩的菌丝制备原生质体，有的菌种如某些担子菌采用孢子制备原生质体。制备的原生质体需要考虑原生质体释放量、原生质体再生率及节约成本等因素来确定最佳的制备条件。

4.2 外源 DNA 转化丝状真菌的原生质体

一般认为外源 DNA 进入真菌的原生质体是由于细胞的吞噬作用。在聚乙二醇的介导下，外源 DNA 与原生质体在等渗溶液中混合，在低温或室温条件下共存一定时间，在细胞的吞噬作用下，外源 DNA 进入真菌的原生质体细胞。外源 DNA 可以是环形的质粒载体，也可以是线形 DNA 片段。一般来讲，线形 DNA 比环形 DNA 的整合效率高。在有限制性酶存在时，线形 DNA 的转化效率明显提高。限制性酶介导的 DNA 转化原生质体的方法简称 REMI。

5 REMI 转化

REMI 插入突变是在限制酶介导下用质粒 DNA 转化真菌，通过质粒 DNA 的异源准随机插入而使基因突变，从而直接获得基因标记的一项新技术。REMI 插入突变的优点：

(1) 便于高效快速地分离目的基因，突变体用已知序列的分子标签标记。利用标签质粒的 DNA 序列和单拷贝插入的特点，可以通过“质粒拯救”，反向 PCR 等技术快速、高效分离标记基因。

(2) 转化率较高，现有的报道普遍证明 REMI 可以提高真菌的转化效率，在 *Aspergillus nidulans* 中转化效率可以提高 20～60 倍；*Colletotrichum graminicola* 转化效率提高 27 倍。

(3) 增加单拷贝插入的概率，质粒进入细胞后只要没有整合到染色体上就容易受限制酶的攻击，并且容易整合到染色体酶切位点上，若缺乏限制酶，质粒 DNA 容易串联在一起，造成多拷贝整合。不同的真菌研究系统，其突变体的频率有很大差异，一般可达 0.1%～

0.6%。REMI 插入突变对丝状真菌的突变和基因标记是十分有效的，在 *M. grisea* 中已经标记了 30 多个与产孢、附着胞形成或致病性相关的基因。

方案 1　稻瘟病菌(*Magna porthe grisea*)原生质体的制备及转化

1. 原生质体的制备

(1) 活化 Guy-11，在 CM 平板上生长 6 天左右，菌落直径约 3cm。

(2) 切取两个直径约 3cm 的菌落，置于 150ml CM 液体培养基中，用捣碎器将其捣碎；然后均匀分装到两瓶 200ml CM 液体培养基中，28℃，125r/min，培养 48h。

(3) 收集菌丝：4 层纱布过滤收集，用无菌水冲洗两遍，将水分压干，称湿菌丝的重量。酶液的配制：用 0.7mol/L NaCl 溶解 Glucanex，酶液浓度 7.5mg/ml，用细菌过滤器过滤除菌。酶液与菌丝的比例为 2∶1，即每 1g 湿菌丝加入 2ml 的酶液(加入抗生素)。

(4) 30℃酶解，80r/min，2～3h。

以下步骤均在 4℃低温条件下完成：

(5) 取出酶解液，0.7mol/L NaCl 洗涤，3 层擦镜纸过滤，除去残渣，滤液收集到 50ml 的离心管中。

(6) 离心，4℃，3 000r/min，10min。

(7) 用 10～20ml STC 悬浮沉淀，用枪头轻轻地吹打，不能太重。4℃，3 000r/min，离心 10min；重复 2 次。

(8) 取适量的 STC 悬浮沉淀，使终浓度为 10^8 个/ml。分装，每管 150μl，转化或于 −80℃保存。

2. 转化(室温或者冰上)

(1) 取 150μl 原生质体，放入 50ml 离心管中，加入 1μl 内切酶，2μgDNA，轻轻混匀，室温下放置 25min。

(2) 逐滴加入 1ml PTC，混匀，室温放置25min。

(3) 缓慢加入 5ml OCM 液体培养基，轻轻摇匀，置于 28℃，100r/min，摇过夜。

(4) 过夜培养的原生质体，每管加入含有 200μg/ml 潮霉素的固体 OCM Top 培养基，混匀，倒平板(含有 OCM Bottom)，每管 3 个平板。黑暗，28℃，培养。

(5) 1 周后，挑取突变子。在含有 300μg/ml 潮霉素的固体 CM 上再次筛选验证。

(6) 将获得的突变子，接种到 CM 培养基上，进行菌种保存。

方案 2　毛壳菌原生质体的制备

1. 毛壳菌 *Chaetomium globosum*(CG10)于 PDA 平板上活化，25℃培养至产生子囊壳。

2. 取毛壳菌子囊壳，放入小玻璃试管(加玻璃珠)，加 1ml 0.7% NaCl，旋涡振荡粉碎。

3. 孢子计数。取 1×10^8 个孢子于 250ml CM 液体培养基中培养，28℃，180r/min。培养 24h。

4. 或者采取菌丝培养的方法：毛壳菌菌丝捣碎，再接种于 CM 液体培养基，加100μg/ml氨苄西林，28℃，180r/min。培养 12～24h。

5. 取毛壳菌培养液，用 3 层擦镜纸过滤。用 30ml 0.7mol/L NaCl 冲洗。

6. 毛壳菌菌丝放入 15ml 酶液中消化(菌丝湿重 g 与酶液体积 ml 之比为 1∶1)，使菌丝分散，30℃，100r/min，消化 3.5～4h。(溶壁酶 10mg/ml，0.7mol/L NaCl，不调 pH，加青

霉素以抑制细菌生长。)

7. 用 3 层擦镜纸过滤毛壳菌消化液,用 25ml 0.7mol/L NaCl(4℃)冲洗,滤液入 50ml 离心管。(以下保持温度为 4℃。)

8. 滤渣菌丝移入 20ml 0.7mol/L NaCl 中洗涤。用 3 层擦镜纸过滤。用 20ml 0.7mol/L NaCl 冲洗,滤液倒入 50ml 离心管。重复上述洗涤 2～3 次。

9. 离心,3 000r/min,10min,4℃。

10. 去上清液,加 5ml STC(1.4mol/L sorbitol,10mmol/L Tris-HCl pH7.0,10mmol/L $CaCl_2$),小心混匀(可用移液器轻轻吹打)。

11. 4℃,3 500r/min,离心 10min。

12. 去上清液,加 5ml STC,小心混匀。

13. 4℃,3 500r/min,离心 10min。

14. 去上清液,加 1ml STC,小心混匀。计数。

15. 用 STC 稀释至密度为 4×10^7/ml。分装于 1.5ml 离心管,每管 150μl。—80℃保存。

6 真菌 ATMT 转化

农杆菌介导转化技术(ATMT)在植物中应用已经有 20 多年的历史,近几年 ATMT 技术转化真菌的方法发展起来。到目前为止已在 10 多种真菌上取得成功。

ATMT 的优点是:

(1) 受体来源简单,可以用原生质体、菌丝、孢子和蘑菇的菌褶等;可以用不同生长时期的真菌作受体,因此,选择具有单核的分生孢子作为受体可以得到后代不分离的转化子,避免真菌菌丝的多核所造成的转化子不稳定的难题。

(2) 得到的转化子基因组中插入比例高,T-DNA 整合入染色体时是随机的,并且一般是单拷贝插入,有利于分析标记的基因;这使得 T-DNA 可以作为丝状真菌基因突变研究中的一个标记使用,从而使基因标记、启动子捕获和基因活化等研究可以进行;同样也将成为真菌基因功能分析的一个有用工具。

(3) 这一方法有可能使外源的高分子质量 DNA 插入真菌染色体中,因为在植物细胞转化中,农杆菌可转移 150kb 的外源 DNA。

方案 3 感受态农杆菌细胞的制备与转化

构建好的载体通过冻融法转化到农杆菌菌株 AGL1 中,用于 ATMT 转化。

1. 将农杆菌菌株在 LB 平板上活化,然后转到 5ml LB 液体培养基中 28℃振荡培养过夜(菌可适当多加一点,因为农杆菌在 LB 中的生长速度较慢)。

2. 转移 2ml 此培养液到装有 50ml LB 液体培养基的三角瓶中 28℃振荡培养至 OD_{600} 0.5～1.0。

3. 冰上放置停止生长,4℃,3 000g 离心 5min。

4. 沉淀用 1ml 预冷的 20 mmol/L $CaCl_2$ 溶液悬浮,分装到预冷却的离心管中,每管 0.1ml。

5. 加 1μg 的 DNA 到上述离心管中,液氮中冷冻。

6. 37℃水浴 5min 解冻。

7. 加入 1ml LB 液体培养基，28℃轻摇 100r/min 培养 2～4h。

8. 将培养好的菌液涂于含有卡那霉素的 LB 平板上，正面放置 30min，待菌液完全被培养基吸收后，倒置培养皿，28℃培养 2～4 天。

方案 4　利用农杆菌转化真菌

试剂：

农杆菌诱导培养基 AIM 配方：

0.8 ml 1.25 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH 4.8（用 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 配制）

20 ml MN 缓冲液（30 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，15g/L NaCl）；

1 ml 1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$（*W*/*V*）；

10 ml 0.01 % $FeSO_4$（*W*/*V*）；

5 ml 微量元素储备液（spore elements）（100 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$，100 mg/L $CuSO_4 \cdot H_2O$，100 mg/L H_3BO_3，100 mg/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$）（过滤灭菌）；

2.5 ml 20% NH_4NO_3（*W*/*V*）；

10 ml 50% 甘油（*V*/*V*）；

40 ml 1 mol/L MES pH 5.5（用 NaOH 调 pH）；

20% 葡萄糖（*W*/*V*）L 液体培养基中加 10 ml，固体培养基加 5 ml；

加水至 1L，固体培养基加 1.5%琼脂粉（200mol/L AS-用二甲基亚砜 DMSO 配制）。

方法与步骤：

1. 稻瘟病菌的 T-DNA 转化

（1）从新鲜培养的 LB 平板（含 50g/ml 卡那霉素）上挑选一农杆菌单菌落接种于 5ml LB 液体培养基（含 50μg/ml 卡那霉素），200r/min，28℃过夜培养。

（2）第二天，将 200～400μl 培养液转移到 5ml 含 50g/ml 卡那霉素的诱导液体培养基（AIM）中，OD 值约 0.15，28℃培养 5～6h 使 OD_{600} 达到 0.5～0.6。

（3）稻瘟病菌分生孢子的收集：用 10ml 灭菌蒸馏水从培养大约 10 天的 CM 平板上洗下稻瘟病菌的分生孢子，3 层擦镜纸过滤后用血球计数板计数，并用无菌水稀释孢子浓度为 10^6 个/ml。

（4）取 100μl 培养好的农杆菌 AGL-1（含载体）菌液和 100μl 稀释好的稻瘟病菌分生孢子悬浮液混合，混合液（200μl）均匀涂于 AIM 平板上的硝酸纤维素膜表面，IM 平板含 200μmol/L 乙酰丁香酮（AS，acetosyringone）或不含 AS 作为对照，22℃培养 48h。

（5）将硝酸纤维素膜转移到含潮霉素与抗生素的选择平板上，选择性培养基中含 250μg/ml 潮霉素（hygromycin B）、400μg/ml 头孢霉素（cefotaxime）、60μg/ml 链霉素（streptomycin），将平皿置于 28℃下培养到转化子出现。

（6）将转化子接种到含 100μg/ml 潮霉素的 CM 平板上再次鉴定。

2. 球毛壳菌的 T-DNA 转化

（1）从新鲜培养的 LB 平板（含 50μg/ml 卡那霉素）上挑选一农杆菌单菌落接种于 5ml LB 液体培养基（含 50μg/ml 卡那霉素），200r/min，28℃过夜培养。

（2）第二天将 200～400μl 培养液转移到 5ml 含 50μg/ml 卡那霉素的诱导液体培养基（AIM/LB+AS）中，OD 值约 0.15，28℃培养 5～6h 使 OD_{600} 达到 0.5～0.6。

(3) 球毛壳菌子囊孢子的收集：用 5ml 灭菌蒸馏水从培养好的 PDA 平板(7 天/22 天)上洗下球毛壳菌的子囊壳，在装有无菌玻璃珠(直径 5mm)的试管中，涡旋振荡后，3 层擦镜纸过滤，用血球计数板计数，并用无菌水稀释到合适的孢子浓度(10^5～10^7个/ml)。

(4) 取 100μl 培养好的农杆菌 EHA14-5、C58C1-5(含载体)菌液和 100μl 稀释好的毛壳菌子囊孢子悬浮液混合，混合液(200μl)均匀涂于 AIM 平板上；或者混合液(200μl)加入含 500μl AIM 液体培养基的 1.5ml eppendorf 管中，120r/min；27℃共培养 48h。

(5) 在 AIM 底板上覆盖一层 10ml 的含氯嘧磺隆与抗生素的选择平板，或者将液体培养物与冷却至 45℃的选择性培养基混合后铺板。选择性培养基中含 300 μg/ml 氯嘧磺隆(sulfonylrate)、400 μg/ml 头孢霉素(cefotaxime)、60 μg/ml 链霉素(streptomycin)，将平皿置于 25℃下培养到转化子出现。

(6) 将转化子接种到含 300μg/ml 潮霉素的 CM 平板上再次鉴定。

7 电击转化

方案 5 Tapesia yallundae 的电击转化

试剂：

Czapek Dox 培养基(Oxoid)，山梨醇，Novozyme234，纱布。STC：1.2mol/L 山梨醇，10mmol/L Tris-HCl pH7.4，10mmol/L $CaCl_2$。再生培养基：1mol/L 蔗糖，0.5%酵母提取物，0.1%蛋白胨。

方法与步骤：

1. 收集 10^6的孢子接种到 10ml Czapek Dox 培养基中，18℃，100r/min，孢子萌发过夜。

2. 收集萌发的孢子，2 500g，离心 10min，用 5ml 预冷的无菌水冲洗沉淀 1 次，然后用 5ml 预冷的 1mol/L 山梨醇洗沉淀 1 次，2 次洗涤，均为 2 500g，10min。

3. 10ml 1mol/L 山梨醇(包括 5mg/ml Novozyme234)悬浮沉淀，于 25℃，50r/min，摇 2h。

4. 用 4 层滤纸过滤收集原生质体。

5. 将原生质体转移到 30ml 的离心管中，100g，5min，集中细胞。25ml 1mol/L 山梨醇缓慢地洗涤沉淀 3 次。

6. 沉淀悬浮到 10ml 预冷的 STC 中，用血细胞计数板计数，然后 100g，离心 5min，去掉 STC。

7. 重新悬浮沉淀 10^8原生质体/ml，1μg/μl 的 DNA 3～6μl 加入到 50μl 原生质体中，轻轻混匀，然后转移到电击转化管中。

8. 在 200Ω，25μF，0.7kV(3.5kV/cm，0.4ms)条件下电击。

9. 电击结束后，迅速加入 1ml 预冷的再生培养基，室温培养过夜，使其恢复生长。

10. 将恢复生长的转化细胞涂于选择培养基培养，筛选转化子。

8 转化 DNA 的命运

8.1 DNA 整合

转化的 DNA 进入丝状真菌细胞并不意味着它一定能成为有用的工具。对于啤酒酵母

来说，几乎所有在非自主复制的质粒上转化 DNA 均通过同源重组整合到基因上。但是，对于丝状真菌而言，同源整合概率低于啤酒酵母。

8.1.1　转化 DNA 的同源重组

环形 DNA 分子整合到染色体同源序列的相应位置，该整合带来被载体选择标记分开的同源序列的串联复制，这种整合形式可能不稳定，因为基因组中存在串联重复序列。这个整合的逆过程导致整合上的载体序列和选择标记的丢失，恢复最初该位点染色体的结构。线形 DNA 分子的整合方式有两种，一种是 DNA 分子被插入的选择标记打断；第二种是发生同源重组导致染色体序列与这些线形 DNA 分子置换。这种形式的整合后产生的染色体结构稳定。而且，转化 DNA 整合不需要有广泛的序列同源性，导致整合的有同源重组和非同源重组，两者之间的比例随受体和转化载体而异。

8.1.2　直接和间接的基因替换

在啤酒酵母中，转化 DNA 和染色体间的同源重组可实现直接和间接的基因替换。根据这一理论，在丝状真菌中包括同源重组转化可能实现直接和间接的基因替换，但效率比啤酒酵母低。

8.1.3　基因破坏

外源 DNA 整合到真菌的基因组中，如果整合位点的基因由于外源 DNA 序列的插入而破坏基因，可产生无义突变或功能缺失突变。基因破坏所涉及的复杂结构或过程需要不同的途径，这一类的功能缺失突变可能导致细胞死亡。

8.2　质粒拯救

方案 6　丝状真菌中的质粒拯救

试剂：

限制性内切酶，3mol/L 乙酸钠 pH 5.6，酚/氯仿/异戊醇，氯仿，乙醇，连接酶，感受态细胞。

方法与步骤：

1. 提取高质量的真菌转化子的基因组 DNA；设置一系列的限制性内切酶，酶解基因组 DNA，1～10ng 的基因组 DNA，＞20U 限制性内切酶（注：限制性内切酶是质粒 DNA 上没有酶切位点的酶）。

2. 酶切过夜，加入等体积的酚/氯仿/异戊醇（25∶24∶1）。涡旋振荡 10s，10 000g 离心 5min，使水相和有机相分离。

3. 将上清液转移到新的离心管中，再用等体积的氯仿抽提水相。

4. 加入 2.5 倍体积的乙醇和 0.1 倍体积的 3mol/L 乙酸钠（pH5.6），混匀，－20℃ 30min。

5. 10 000g，离心 20min；70％乙醇溶液洗涤沉淀，晾干。

6. 20μl 的 ddH_2O 重悬 DNA，加入连接酶和缓冲液，16℃连接过夜。

7. 连接液转化 *E. coli* 感受态细胞。

8.3 热不对称 PCR

在基因组相关研究中，分离与已知序列邻近的 DNA 片段是一项很困难的工作。TAIL-PCR，即热不对称 PCR(thermal asymmetric interlaces PCR，TAIL-PCR)，是一个获得已知 DNA 片段邻近序列片段的有力工具。TAIL-PCR 是在单侧 PCR 基础上发展起来的一种 PCR，使用两种不同长度的引物，两种引物的退火温度不同。长引物是以已知插入序列设计的 3 个嵌套引物，退火温度 *Tm* 为 58～63℃；短引物是任意兼并引物，可与 DNA 随机结合，*Tm* 为 47～48℃。PCR 温度循环的每一循环包括：两个高温退火反应，这时只有长引物退火并扩增；一次低温退火并延伸，这时两种引物同时退火并扩增。通过热不对称 PCR 循环的交替作用，大大增强了目的分子的优势扩增，使得 PCR 产物的特异性大大增强，减少了非特异靶序列的扩增。

8.4 启动子陷阱技术在丝状真菌中的应用

目前已发展了三种不同的陷阱系统——增强子陷阱、启动子陷阱和基因陷阱。它们之间最大的不同体现在报道基因重组体的组成和插入位置上。基因陷阱是这三种方法的统称(图 3-2A)。

增强子陷阱(enhancer trap)将某报道基因与一个精巧的启动子相连，组成一增强子陷阱重组体，它不会自主起始转录，而需由被插入的细胞基因组中的增强子帮助才可转录(图 3-2B)。若报道基因最终表达，则可推知插入位点附近有增强子或有基因，即实现了以该增强子陷阱重组体发现增强子的目的。启动子陷阱(promoter trap)通过将报道基因插入到细胞基因组的外显子上，一旦发现它与细胞基因组基因被共同转录或表达，则可知该报道基因附近有启动子，从而起到了以之为诱饵，发现启动子的目的，这就是启动子陷阱(图 3-2C)。

基因陷阱(gene trap)重组载体由报道基因和接受体剪接部位(splice acceptor，SA)组成(接受体剪接部位在报道基因上游)，该重组载体需要插入到细胞基因组中，随着基因转录和表达，故如能检测到融合转录物或融合蛋白，则证明插入位置附近有基因存在(图 3-2D)。启动子陷阱和基因陷阱都有位置限制，前者需插入到外显子，后者则需插入到内含子，增强子陷阱却没有位置限制；由于增强子与基因的位置可近可远，故增强子陷阱不易定位基因；此外，对启动子陷阱和基因陷阱而言，插入可能导致基因失活。

8.4.1 启动子陷阱技术

启动子陷阱技术的原理是将一个无启动子的报告基因随机插入到基因组 DNA 中的某一基因附近，在该基因启动子的作用下，转录产生融合转录物。该融合转录物中，报告基因的转译元件是正常的，可以转译蛋白，通过报告基因筛选转化子，使用标签序列对标签旁侧序列进行分析、对比，从而确定其性质。

8.4.2 方法步骤(以稻瘟病菌为例)

(1) 载体的构建：我们构建了两种启动子陷阱载体。

1) 以载体 pCB1003 为骨架，在 *Bam*HI 和 *Xba*I 位点处，插入没有启动子的 eGFP 片段，形成启动子陷阱载体 pCBGFP。

2)以载体 pEGFP 为骨架，在 *Not*I 和 *Stu*I 位点处插入潮霉素抗性基因片段，形成启动

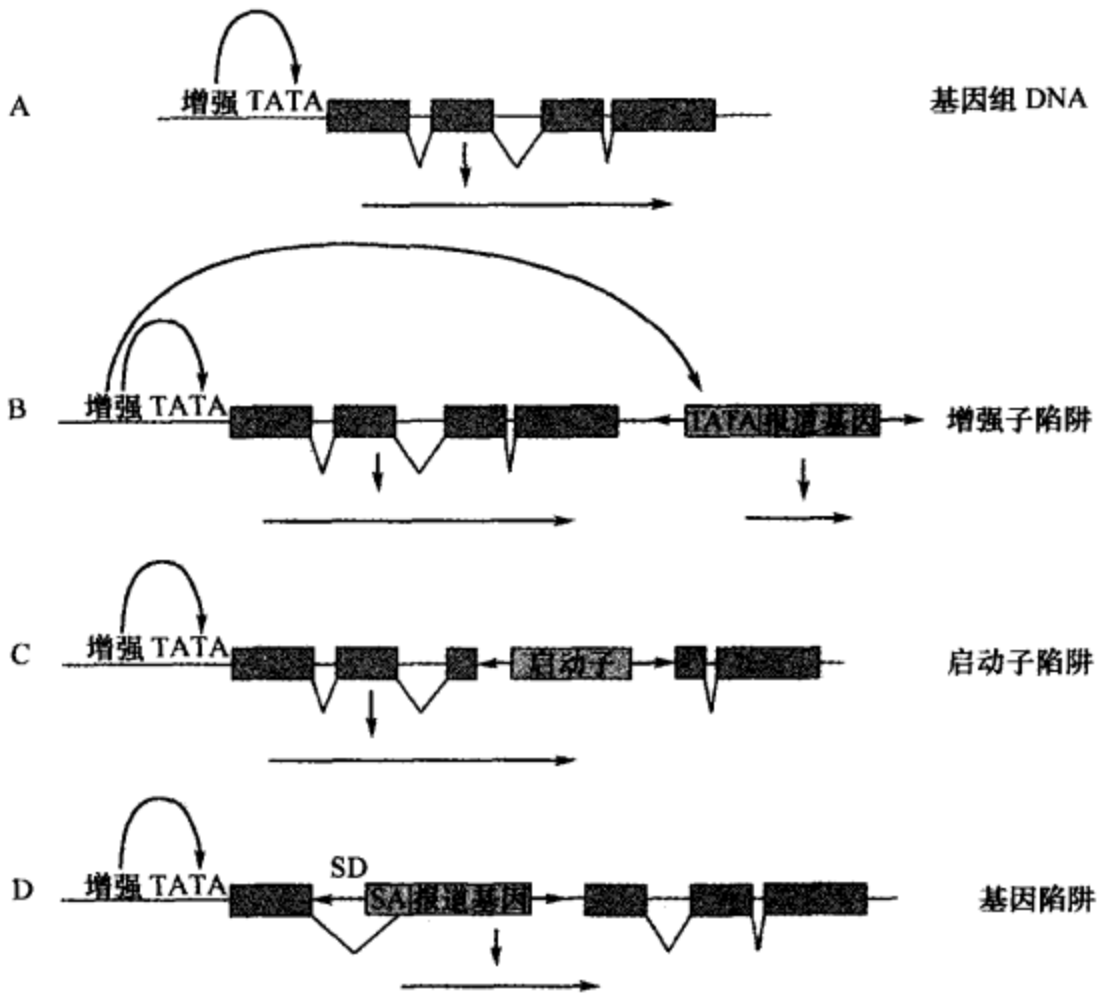


图 3-2　各种基因陷阱的结构

A：基因组 DNA 的一条染色体上某个基因(外显子为带斜线盒状部分；内含子为线状用 V 形标注出，表示会被切除；各基因陷阱重组体为空白盒状；B、C、D 图中带黑箭头区域表示外源插入部分)。B：增强子陷阱。由启动子(TATA)和报道基因(reporter)构成的重组体，插入到基因的增强子附近(图中所示为第二个外显子下游)，报道基因的启动子被该基因的增强子激活，导致报道基因表达。C：启动子陷阱。报道基因插入到基因外显子(图中所示为第二个外显子)之中，并借助该基因的增强子和启动子被转录和表达。D：基因陷阱。受体剪接部位(splice acceptor，SA)和报道基因重组体插入基因内含子中，则转录时受体剪接部位与该基因内含子一起被切除，得到融合基因转录产物

子陷阱载体 pEGFPHPH(图 3-3)。

以上两个载体分别具备了抗性基因标记和缺乏启动子的报道基因标记，报道基因插入到基因外显子之中，并借助该基因的增强子和启动子才能被转录和表达。

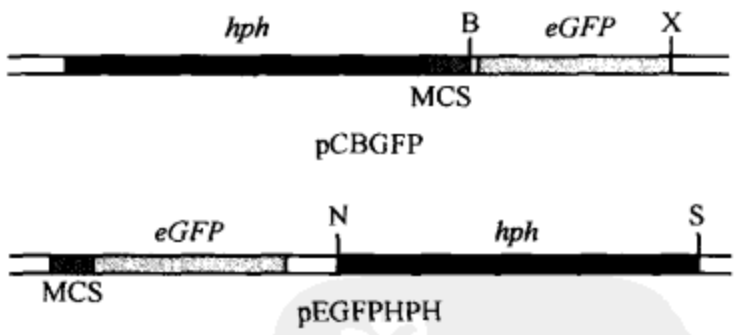


图 3-3　启动子陷阱载体构建

(2) 原生质体的制备转化见前述的方案 1。

(3) 突变体的表型分析。

获得的突变子，在荧光显微镜下观察各个发育阶段(分生孢子、菌丝、附着胞)的荧光表达情况(显微镜的型号：Olympus-BX51)(图 3-4)。

方案 7　农杆菌电击转化感受态的制备与转化

材料：

农杆菌储藏菌株，储存在超低温冰箱中。如果在－20℃存放，则几个月就死亡；10%甘油(V/V)，高温灭菌，用时放在冰上预冷；LB 液体培养基；LB 固体培养基；ddH_2O，灭菌，用时放在冰上预冷；液氮。

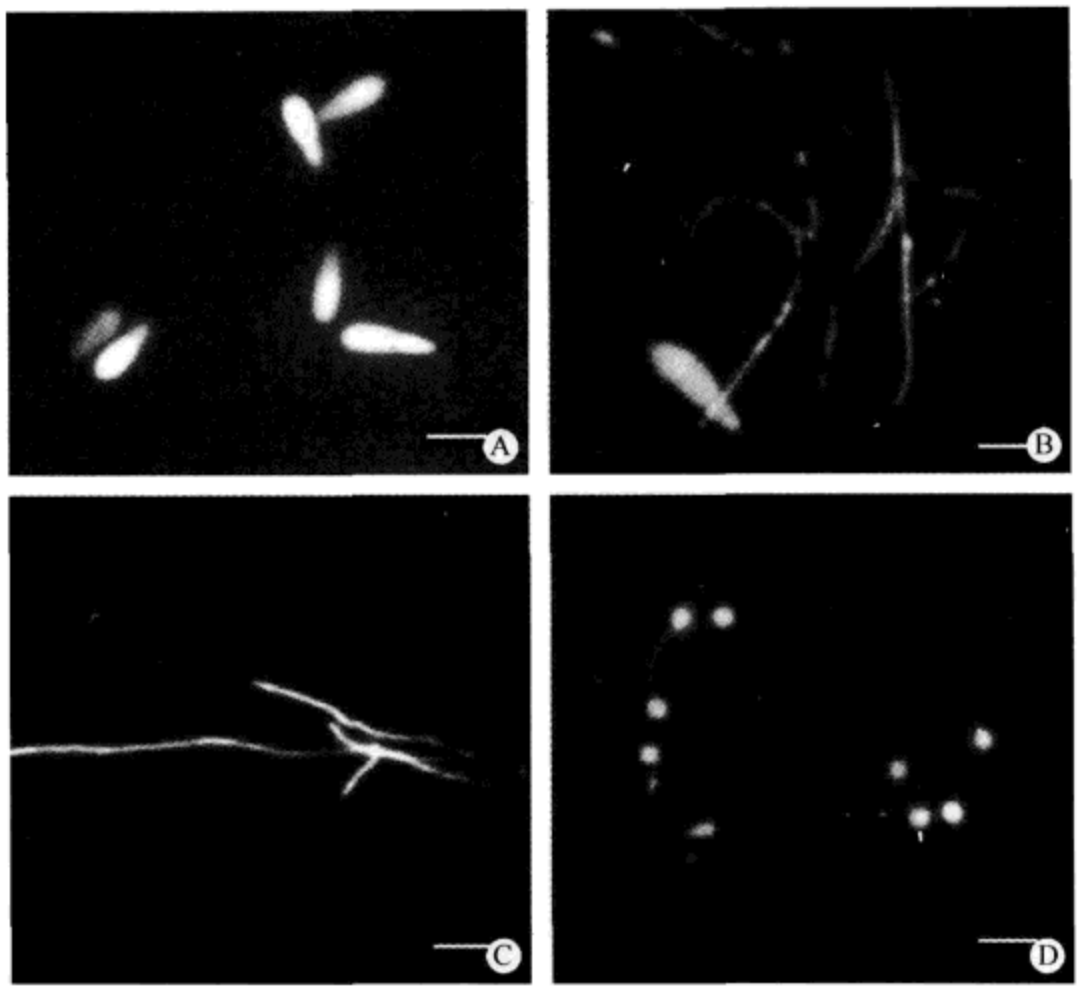


图 3-4 稻瘟病菌启动子陷阱突变体荧光表达

A:分生孢子;B:气生菌丝与分生孢子;C:孢子萌发形成的菌丝;D:附着胞

仪器:

电击杯(Bio-rad 公司),如果是用过的,一般存放在 70%乙醇溶液中,用前先用无水乙醇冲洗,然后放在 −20℃预冷;高速离心机,转子要提前预冷;电击仪(Bio-rad 公司);摇床;分光光度计;制冰机;封口膜,移液吸头。

方法与步骤:

1. 感受态的制备

(1) 将储存在超低温冰箱中的农杆菌菌株(如 AGL-1)在 LB 固体培养基上活化,28℃培养 2 天。

(2) 挑一个单菌落于 6 ml LB 液体培养基中,于摇床 28℃剧烈摇动培养 24h。

(3) 取 5 ml 菌液放入 500 ml LB 液体培养基中,于摇床 28℃剧烈摇动培养至对数生长期(OD_{550} 0.5～0.8,约 10h),然后放入冰水中冰浴。以后的步骤都要保持 4℃。

(4) 将菌液转移到 50 ml 离心管中,每管放 40 ml 左右。在超速离心机上在 4℃用 4 000g 的离心力离心 10 min,收集细胞,弃去上清液。

(5) 在每个 50 ml 离心管中加入约 5 ml 预冷的 ddH_2O 中,用剪掉头的 1 ml 移液管轻轻吹打至没有菌块为止。

(6) 添加预冷的 ddH_2O 使总体积至 250 ml。

(7) 重复步骤(4)、(5)两次。第一次离心后,添加预冷的 ddH_2O 使总体积至 100 ml。第二次离心后,添加预冷的 ddH_2O 使总体积至 45 ml。

(8) 在超速离心机上在 4℃用 4 000g 的离心力离心 10 min,收集细胞,弃去上清液。

(9) 加入 10%甘油 15 ml,重新悬浮。

(10) 在超速离心机上在 4℃用 4 000g 的离心力离心 10 min,收集细胞,弃去上清液。

(11) 加入 10%甘油 5 ml,重新悬浮。

(12) 取 50 μl 的液体细胞至 1.5 ml 离心管中,盖好盖子,用液氮迅速冷激,然后放到−70℃超低温冰箱中储存备用。

2. 转化

(1) 在冰上融化一管感受态细胞(50 μl)。

(2) 加入 1μl 纯化好的 DNA(DNA 必须用 ddH_2O 溶解),在冰上轻轻混匀。

(3) 将混匀的细胞转移到电击杯中,注意沿着杯壁慢慢放入,以防形成气泡。

(4) 将电击杯放入电击仪中,设定好合适的参数,电击。例如,用 Bio-Rad 电击仪,电击杯是 2mm 宽度规格,则电压用 2.4 kV,电阻是 200 Ω,电量是 25 μF,电击时间约是 5ms。

(5) 电击后,用 1 ml 的 LB 液体培养基冲洗电击杯,并转移到 1.5 ml 离心管中,在 28℃培养 3～4h。

(6) 在离心机上 12 000r/min 离心 1min,收集细胞。

(7) 用 LB 液体培养基 100μl 重新悬浮,涂布到含有合适抗生素的 LB 平板上,28℃培养 2～3 天。

(8) 挑取单菌落于 5 ml 的 LB 液体培养基中震荡培养 1 天,提取质粒检测(碱法提取),或者通过 PCR 检测。

(9) 经过检验是正确的菌体,加入甘油保存在−20℃(短期)或者−80℃(长期)备用。

第四章　丝状真菌的遗传分析

1　子囊菌遗传分析

1.1　概述

丝状真菌基因组小，生活周期短，单倍体时间在生活周期中占的时间长，操作简便易行，因此，很早就成为真核生物遗传学研究中重要的模式生物，特别是构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）和粗糙脉胞霉（*Neurospora crassa*）。这些生物的优点是不但可以非常方便地进行经典遗传学和分子遗传学的研究，而且因为它们是单倍体，在构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）和粗糙脉胞霉（*Neurospora crassa*）可以相当直接地产生并分析突变体。在这些真菌中已经有一系列的方法可以有效地产生突变体，从传统的化学诱变到最近的以DNA转化为基础的诱变策略。相应地，许多的筛选程序迅速发展起来，用于筛选目的突变体。一旦得到一个突变体，还必须能够有明确的特点，使研究者可以确定相关性状是单位点突变还是多位点突变，是隐性突变还是显性突变。在丝状真菌中已经有许多的方案来回答这些问题，而且在过去的几十年中已经成为至关重要的经典程序。编写这部分的目的是对用于子囊菌遗传分析的方法技术进行总结，特别是以在构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）、粗糙脉胞霉（*Neurospora crassa*）及稻瘟病菌（*Magnaporthe grisea*）为重要研究对象。第一部分主要对鉴定和分离突变体的策略进行总结，后一部分是对分析突变体的方案进行概括。

1.2　鉴定和分离突变体

1.2.1　考虑的重点

对子囊菌进行诱变有许多相当直接的可行方案。但是，在设计诱变策略之前，必须考虑至关重要的两点。

（1）第一个考虑的因素是由于丝状真菌是多细胞的，必须选择合适的细胞类型来诱变。

影响细胞类型选择的主要因素有：

1）细胞内细胞核的数目和倍性：单核细胞含有单倍体的细胞核是最理想的诱变材料，例如构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）。

2）获得大量纯净细胞的能力（一般要达到 1×10^7/ml）。

在利用物理、化学诱变方法进行诱变时，这些因子尤其重要。相反，如果应用一种插入诱变策略（如RIMI），这些问题可以通过在选择目的突变体之前纯化转化子来克服。

（2）第二个重要的考虑因素目的是突变体的特性。

一些方法如典型的RIMI等涉及在整个基因组中的相对随机的位点插入选择性标记。虽然RIMI的重要优点是能够快速克隆突变基因，但这种方法只能产生基因功能完全丧失

的突变体。通常，简单的超表型突变体或者条件突变体往往比简单的基因功能完全丧失的突变体含有更多的遗传信息。在这种情况下，物理的或者化学诱变具有导致碱基替换的倾向(例如紫外诱变或者单环芳香烃环化剂如 4NQO、MNNG、EMS)，这样的诱变策略可以考虑。另外，如果要应用缺失突变，物理诱变剂如粒子辐射或者双环化诱变剂如 DEB 或者 DEO 等，均可以应用。DEB 或者 DEO 在诱变黑曲霉中表现得非常有效，但要特别注意，一定的化学诱变剂产生很强的诱变谱，由于这具有相反的影响，可以抑制氨基酸替代的数目，绝对地应用一种诱变方法可能对达到研究的目的不利。

1.2.2　化学诱变

虽然以下操作步骤是采用 4NQO 对真菌的孢子进行诱变，但是这个程序也可以用于其他真菌用其他的化学物质进行诱变。一般诱变采用新鲜收获的孢子进行，因为经过长时间保存，有许多孢子往往没有生活力。大多数化学诱变剂(如 EMS、MMS、DEO、DEB)可以买到货到即用的溶液剂型，那些只能购买到粉末状态的化学药剂(如 4NQO 和 MNNG)，需要用丙酮溶解，配成 50mg/ml 的溶液备用(注意 4NQO 的溶解度很低)。在进行诱变之前，这个程序首先应用，以确定能够产生最大存活率的诱变剂的剂量(浓度)。在大多数子囊菌中，诱变水平可以通过对存活的菌落中产生的颜色突变体或者不能产生孢子的突变体的比例来估计。一旦理想的突变计量明确下来，诱变的孢子常先涂布于非选择性营养丰富的培养基上，使所有的突变体恢复生长。存活下来的菌落再在特异的生长条件下进行测试，来检测目的突变体(例如温度敏感型突变体，营养突变体、药剂抗性突变体等)。在 FGSC 网页上提供了有关 *N. crassa* 和 *A. nidulans* 在各种条件下生长的培养基的配方，非常有用，详见 http://www.fgsc.net/methods/ genmthds.html。

方案 1　对真菌孢子进行化学诱变

试剂：

4NQO(sigma)，EMS、MMS、MNNG、DEB、DEO(Aldrich Chemical)，50% 硫代硫酸钠。

方法与步骤：

1. 用灭菌的 ddH_2O 将 4NQO 稀释到工作储备液的浓度 200μg/ml[a]。

2. 用含有 0.01% Tween 80 的灭菌 ddH_2O 洗孢子(尽量去掉孢子团)。用血细胞计数板统计孢子的浓度，用灭菌的 ddH_2O 将孢子浓度稀释到 1×10^7 个孢子/ml。

3. 在 1.5ml 的离心管中按照以下所列准备诱变混合物：

(1)200 μl 孢子液。

(2)8 μl 4NQO。

(3)800 μl 灭菌的 ddH_2O。

4. 将诱变准备液混合物在 30℃下保持 30min 并不断摇动。

5. 在诱变准备液中加入 100 μl 50% 硫代硫酸钠以终止反应。

6. 高速离心 1min 收集已经诱变的孢子，倒掉上清液，用 1ml 灭菌的 ddH_2O 重新悬浮孢子。

7. 稀释诱变后的孢子，在营养完全培养基平板上，每一个直径 9cm 培养皿涂布约 100～

200 个存活的孢子。平板一般置于 28℃或 37℃下培养[b]。

注：a. 对于其他试剂的贮备液的浓度可以根据经验来确定。

b. 加入其他终止剂如梯恩梯(Triton-100，0.01%，*V*/*V*)或者次氯酸钠(0.08%，*V*/*V*)到生长培养基中可以提高菌落的致密性，易于采用平板复印的方法筛选突变体。

1.2.3 紫外诱变

紫外线是一种高效的诱变剂，可以对许多生物产生突变。紫外诱变的优点是孢子可以在涂布到平板上以后再进行诱变。但是，在诱变之前首先要确定高效突变的紫外辐射的计量和孢子浓度，使诱变后在一个 9cm 平板上存活的菌落数在 100～200 之间比较合适。各种光源的紫外线都可以应用，包括：①手提式紫外灯；②紫外透视器；③紫外交联器。

方案 2 对真菌的孢子进行紫外诱变

设备： 紫外透视器。

方法与步骤：

1. 收集供试真菌的孢子(同本章方案 1)。

2. 稀释孢子，根据每个平板上存活的菌落数在 100～200 的孢子浓度涂布成平板。

3. 将紫外透视器的紫外光打开，用紫外光照射平板。确保在紫外处理时平板的培养皿盖已经打开。处理后的平板置于黑暗处培养，尽量减少光照时间。可以用铝箔纸将辐射后的平板包裹后再培养。

4. 处理后的平板经常培养在 28℃或 37℃下。

5. 应用紫外透视器时，紫外线的强度可以根据辐射时间的长短变化而变化。

1.2.4 诱变后的复选

无论要筛选何种类型的突变体，最有效的复选方法是在选择性培养基和非选择性培养基上进行平板的印迹筛选。这种技术允许菌落生长在平板上的分布形式可以复制到另外的平板上。这样，选择性平板接着进行计数来鉴定在特定地选择性条件下不能生长的菌落。这样的菌落可以从生长在原先非选择性平板上获得。

印迹筛选用的印迹块可以从供应商处购买(VWR 科学应用品有限公司，Bio 101)或者可以自己制作。理想的用于转移菌落的材料是棉绒，湿润的纸塔也可以应用。买到以后，将棉绒剪成 15cm×15cm 的布块，用水洗净。然后用两层铝箔纸包裹后，高压灭菌，备用。用过的布块还可以经过洗涤、灭菌处理后重复应用。供试的平板做好标记，然后进行印迹筛选(replica plate)。但是，主要是菌丝的菌落很难用这种方法进行印迹筛选。在印迹过程中不希望菌落扩展很快，可以通过在培养基中增加抑制剂来减少生长。

1.2.5 突变体的类型

营养缺陷型只能在补充了特定成分的培养基上生长，这种成分对野生型菌株并不需要。在大多数真菌中，组成双核体或者异核体的能力并不需要有效的表型互补，有效的营养突变的选择可以根据对比突变体与亲代菌株的生长变化来进行。另外，多种对真菌转化体系也是采用营养缺陷型标记作为筛选标记。营养缺陷型突变往往通过突变体不能在营

养缺乏培养基上生长来检测。营养缺陷型的特性通过补充不同的营养，看何种营养可以恢复突变体的生长来确定。典型的方案是，在含有5种不同氨基酸、维生素或者嘌呤的营养组合培养基上进行测试（每种成分的有效浓度可以在FGSC网站上获得：http://www.fgsc.net/methods/genmthds.html）。一旦能够恢复生长的营养组合鉴定得到了，每种测试成分再分别进行检测，最终确定是何种营养缺陷型突变体。

不能在高温（Ts）或低温下（Cs）生长的突变体被称为温度敏感型突变体。其他的条件突变体，应用的频率很低，在特定条件下选择的典型类型有对硫元素敏感如二甲基亚砜等。条件突变体主要用于鉴定重要基因的功能。在酵母型子囊菌酿酒酵母和芽殖酵母中，以及少量的曲霉菌中，已经获得了大量的温度敏感型突变体，这些突变体为探索维持细胞功能的重要基因的特征提供了重要的研究资源。

另外的一些有用的突变体类型，包括一些对特殊临床物质产生反应而展现出生长改变的突变体等。一些药物成分的目录纲要可以在文献中找到。

方案3　营养缺陷型突变体的筛选与鉴定

试剂：

1. 维生素类　对氨基苯甲酸，维生素B_2，生物素，维生素B_1，泛酸，烟酸，维生素B_6。
2. 氨基酸类　多种。

方法与步骤：

1. 诱变孢子后，在每个营养丰富培养基培养皿中恢复菌落生长的孢子浓度是100～200个。
2. 用平板印迹法将诱变平板上的菌落复印到不含所要检测的营养成分的少量营养平板上。将原先的平板保存在4℃，将复印的平板置于合适的温度下培养一定时间让菌落生长[a]。
3. 将原来的平板和复印的平板进行对比，把在复印的平板上没有生长的菌落从原来的平板上转移到新的完全培养基的平板上。
4. 待选出的菌落生长后，再在选择性平板上进行确证。确证后的突变体加入15%甘油，保存在－70℃。
5. 通过检测每一个突变体在不同营养成分混合物中的生长，明确突变体的本质特征。当一种混合物可以恢复突变体的生长，重复这个步骤以明确何种营养成分是突变体生长所必需的。

注：a. 在原先平板和复印平板上画一个标记，以便在检查时能够彼此对照。

方案4　温度敏感型突变群体的制备

设备：同本章方案1。

方法与步骤：

1. 诱变孢子和在每个营养丰富培养基培养皿中菌落存活恢复数调整至100～200个。
2. 用平板印迹法将诱变平板上的菌落复印另一个完全营养平板上。将原先的平板保存在4℃，将复印的平板置于限制性温度（一般是42℃）下培养一定时间让菌落生长。
3. 将原来的平板和复印的平板进行对比，将在复印的平板上没有生长的菌落从原来的平板上转移到新的完全培养基的平板上。
4. 待选出的菌落生长后，再在限制温度条件下进行确证。确证后的突变体加入15%甘油，保存在－70℃。

注意:(1) 在原先平板和复印平板上画一个标记,以便在检查时能够彼此对照。

(2) 保存的突变体可以采用显微镜来检测,以获得温度敏感型突变体的缺陷特征。另外,突变体可以进行第二次筛选以获得与设想类型一致的温度敏感型突变体。

1.3 突变体的经典遗传学分析

1.3.1 建立杂交群体

对一个新的突变体进行遗传分析的关键一步是将它与野生型菌株进行交配,这个交配过程包括以下几个关键的过程。

(1) 确认突变表型是由一个单基因突变引起的。

(2) 对产生正确的标记菌株进行表型互补分析。

(3) 在一些真菌如曲霉,构建杂和双倍体可以用于确定突变是显性还是隐性。

2 种常用的方法可以用于杂交试验。第一种方法是简单地将两个亲缘很近的亲代菌株的孢子取下,培养在含有丰富营养培养基的平板上。在双亲菌株的交接区域会发生交配。另外,在 24 孔的细胞板上,每孔中将双亲的孢子(约 1×10^5)共培养在 2ml 的培养液中。混合菌丝体中可以发生交配,再将这些菌丝转移到含有培养基的平板上培养,筛选异核体。后一种方法的优点是,异核体菌丝可以很好地分离,并筛选双倍体孢子。无论哪种方法,进行交配测试的平板往往要培养 1~2 个星期的时间,以便使子实体(闭囊壳或子囊壳)形成并发育成熟。如果构巢曲霉的培养皿置于暗处并包裹后培养,闭囊壳产量很高。还有,如果在少量培养基上进行交配,结果与在丰富培养基上相比,产量有更高的趋势。

1.3.2 随机子囊孢子分析

构巢曲霉能够形成称为闭囊壳的黑色的子实体,由于构巢曲霉是同宗配合,在杂交试验的平板上,交配的双方边缘和交配区外都可以产生闭囊壳。但是,在交配区外形成的闭囊壳体积很大,与在交配区边缘形成的闭囊壳有明显区别。没有成熟的闭囊壳往往含有数千个不规则排列的子囊,每个子囊中含有 8 个子囊孢子(八分体,octadt)。随着子实体的成熟,子囊壁溶解,子囊孢子个体从子囊中释放出来。相应的,一个成熟的闭囊壳中可以形成超过 10^5 个左右的子囊孢子,用尖头镊子简单地挤闭囊壳就可以将子囊孢子收获。

脉胞霉和稻瘟病菌是异宗配合的类型,产生称为子囊壳的子实体。对于稻瘟病菌,子囊壳埋生在平板的琼脂表面以下,只有喙部突出于平板表面。它们可以通过用尖头镊子将子囊壳从琼脂中挖出来获得。典型的子囊壳中含有 20~30 个子囊,用尖头镊子可以很容易地将子囊从子实体中挤出。将挤出的子囊置于营养丰富的平板上,子囊壁会逐渐溶解,释放出子囊孢子。另外,单孢分离可以在子囊孢子释放后进行,将同一子囊中不同的子囊孢子分别培养即可以得到异源的单孢菌落。对于脉胞霉,子囊壳埋藏于杂交平板的菌丝体中。子囊孢子从子囊壳中射出,常常用一个无菌回路,通过浓缩平板表面的水而获得子囊孢子。

方案 5 单孢分离

设备:

体视显微镜;解剖刀。

方法与步骤：

1. 在含有4%的水琼脂的培养皿表面涂约10^3分生孢子[a]。

2. 在体视显微镜下，找到可以很好分离的分生孢子，用一把尖锐的解剖刀仔细将孢子连同下面的琼脂一起切下。

3. 将孢子连同下面的琼脂块一起转移到含有合适生长培养基的新的平板上培养。

注：a. 增加琼脂的浓度提供了一个坚硬的表面，使孢子易于铺展和以后的挖掘。

方案6　构巢曲霉的八分体分析

设备：

体视显微镜；完好的尖头镊子；解剖显微镜；显微操纵器。

方法与步骤：

1. 在体视显微镜下，挑选已经生长2周的闭囊壳，用尖头镊子将闭囊壳转移到含有4%水琼脂的平板上[a]。

2. 用镊子推动闭囊壳在水琼脂平板表面滚动，以使闭囊壳表面的壳细胞、菌丝片断和分生孢子粘在水琼脂上而除去。不要用大的压力，否则将压破闭囊壳。

3. 将干净的闭囊壳转移到含有200μl灭菌水的1.5ml离心管中，在管壁上挤压闭囊壳[b]。

4. 立即检查闭囊壳的内含物是否存在八分体。如果已经有足够数量存在(经常约1%的含量)，用接种环蘸取闭囊壳内含物，从含有丰富营养基平板的边缘在平板上划一条直线[c]。

5. 将此平板翻转，放到显微操作台的载物台上，使平板上划的线处于玻璃针的上方。

6. 通过显微镜在平板的划线上找到一个容易分离的八分体，通过显微操作器，将玻璃针上升调节，轻轻使八分体从平板表面脱离[d]。

7. 用载物台上的为标尺为参照，将八分体转移到远离划线10mm的平板上的一个新位置。

8. 用玻璃针将八分体的子囊孢子逐个分离，如果需要，在显微镜的载物台上轻轻敲击，(成熟的八分体的子囊会相互分离)。

9. 用玻璃针将各个子囊孢子每隔3mm一个，排列成一行，且与原来的划线垂直。

10. 重复步骤6～9，继续分离多个八分体。将每个八分体的子囊孢子平行排列，形成相互平行子囊孢子行列，每行之间的间隔约3mm。

11. 将分离后的平板置于28℃培养2～3天，以使子囊孢子萌发，形成小的单孢菌落。

12. 用牙签将子囊孢子形成的菌落逐个转移到新的完全培养基上，用于以后进一步检测分离标记。

注：a. 增加琼脂的浓度可以使平板表面的硬度加强，利于闭囊壳在平板表面的滚动。

b. 由于构巢曲霉的子囊孢子带有红色，它们是否从闭囊壳中释放非常容易检查。

c. 八分体的外形很像钻石的三维形状，避免四分体和其他异常的4个子囊孢子形成块状，它们常常看起来像一维的钻石形态。

d. 注意正确组装和使用显微操作器。

1.3.3　八分体分析

八分体分析代表了除随机孢子分析外的另一种分析有性杂交特征的方法。八分体分

析的优点是：

(1) 对双突变的鉴定不会出现分歧。

(2) 对于突变的遗传图谱容易构建，特别是对于在中心粒附近的突变。

八分体分析广泛应用于脉胞霉菌 *N. crossa* 的遗传分析。用精细的尖头镊子，可以方便地将子囊从子囊壳中分离出来，在完全培养基上培养一定时间，子囊壁会消解，各个子囊孢子可以萌发生长形成菌落。由于在 *N. crossa* 中子囊的形成是有序的，八分体中各个子囊孢子的位置具有丰富的生物学信息。

与 *N. crossa* 不同，八分体分析在构巢曲霉 *A. nidulans* 杂交分析中的应用很少。这主要是因为原先设想仅仅在闭囊壳发育过程中的某个阶段存在八分体。而且，*A. nidulans* 子囊孢子中度的生活力将掩盖八分体分析的准确性。但是，在特定的条件下，八分体分析的潜在优点将克服这些不足，例如，在构巢曲霉 *A. nidulans* 中，通过减数分裂构建双突变体是一个非常费力的过程，因为每个突变体必须与野生型菌株回交，以确定这两个亲代突变是分离的。相反，通过分离八分体并鉴定八分体展现出非双亲类型的分离表型(图 4-1)，能够非平衡地获得双突变体。

yA× chaA

pD:	4个黄色的分离子，4个黄绿色分离子
NPD	4个绿色分离子，4个浅黄色分离子
TT	2个黄色的分离子，2个黄绿色分离子，2个绿色分离子，2个浅黄色分离子

图 4-1 在一个黑曲霉 *A. nidulans* 杂交中预期的八分体类型

杂交在具有互补型的突变 yA 和 chaA 之间进行。YA 突变可以导致明黄色孢子的菌落，而 chaA 突变导致 charteuse 孢子。yA 和 chaA 的双突变可以导致浅黄色孢子的菌落。注意 NPD 的八分体只是在野生型和双突变体杂交时的分离子的表型

1.3.4 构巢曲霉 *A. nidulans* 中的准性生殖分析

在一定的丝状真菌中，例如构巢曲霉(*A. nidulans*)，准性生殖提供了一个有效的另外的有性杂交方法，以构建双突变体。另外，这个方法常常用于建立一个新的与一个连锁群相联系的突变群体。在无性态真菌例如曲霉 *A. fumigatus* 和 *A. nidulans* 中，准性生殖循环常常是对一个新的突变进行严格地遗传分析的唯一方法。进行准性生殖分析的先决条件是具有构建稳定的双核体的能力。细胞核的融合一般以很低的频率发生在异核体菌丝细胞中，但是，由于异核体只产生单核的分生孢子，双倍细胞能够从双亲菌株具有互补性的营养缺陷型特征和(或)孢子颜色标记。一旦构建成功，双倍体可以繁殖，并可以像单倍体一样保存。

方案 7 通过准性重配确定里连锁群

试剂：苯菜特[a]。

方法与步骤：

1. 采用本章 1.3.1 的方法建立一个含有设计突变的菌株和一个具有合适标记的菌株之间的杂交处理[b]。

2. 将交结的菌丝区域的菌丝块转移到少量营养琼脂培养基平板上，对异核体的生长进行选择，当有扇形的菌丝体从菌丝块上长出时，即说明有异核体的形成。将一块异核体

菌丝体切下并转移到另一种少量营养琼脂培养基平板上。

3. 用灭菌的双蒸水收集异核体上产生的分生孢子，在 20ml 融化的少量营养培养基中加入按 5 倍稀释的分生孢子(如 1μl、5μl、50μl 等)，倒入培养皿中制作平板。

4. 将这些平板培养 2～3 天，使孢子形成菌落。通过检查孢子的颜色和大小，双倍菌落可以从杂合体和单倍体中区分开来[c]。

5. 用牙签将双倍体菌落转移到新的少量营养培养基平板上，继续生长 2～3 天，从双倍体上收集分生孢子作为贮存物。

6. 在添加了苯菜特的含有完全营养的 CM 平板中央涂一道双倍孢子带，置于 28℃培养 5～7d，在培养过程中，单核菌丝会以扇形从双倍体孢子带中长出[d]。

7. 在一个 CM 平板背面纵横方向划上线，将平板分成网格状，从单核的扇形菌落中切取小块菌落，转接到 CM 平板的网格中(例如，每个网格中接一个扇形单核菌落，26 个菌落/平板)，制作主平板。

8. 用牙签将主平板上的菌落转接到合适的培养基平板上，记录单核菌落含有或缺失分离标记。

注：a. 知道杀菌剂商品名称的活性成分可以更容易获得研究所需要的杀菌剂(苯菜特的成分是苯并咪唑，可以从农药商店、园艺商店和其他服务机构获得)，苯并咪唑要首先悬浮在 50%的酒精中，用时加入到灭菌的 CM 培养基中(浓度为 5～50μg/ml)。

b. 用于制作遗传图谱的菌株，一条染色体上至少带有一个已知标记。脉胞霉和曲霉的染色体标记可以从美国真菌保藏中心获得(网址：http://www.fgsc.net)。

c. 双核体往往比单核体产生更多的分生孢子。而且，在建立准性生殖的过程中，建议采用具有互补性的孢子颜色突变体作为亲代菌株(例如 wA＝白色孢子，yA＝黄色孢子)。这样，双核菌落是绿色的，而杂合菌落将展示带有白色-黄色杂色的形象。苯菜特敏感性检测也可以用于从单核体中选择双核体。

d. 单核体扇形表达了隐性孢子颜色标记，容易识别。

准性生殖循环的关键方面是具有双倍体基因组回到单核体状态的能力。正常情况下，单核体的形成频率很低(大约 $1/10^3$)。但是，双倍体微管解聚化合物的开发大大增强了这个比率，并且促发了染色体片断丢失造成的基因重排。因此，可见的单核体扇形产生了，从而可以进一步对相应标记的分离情况进行检测。

方案 8　稻瘟病菌温度敏感型突变体的筛选

实验材料：

1. 菌株和品种　稻瘟病菌菌株是 Guy-11。

2. 培养基

(1) CM(完全培养基)：50ml 20×氮盐储备液，1ml 微量元素储备液，10g D-葡萄糖，2g 蛋白胨，1g 酵母浸出物，1g 酪蛋白氨基酸 1ml 维生素溶液，在 800ml 蒸馏水中溶解，调节 pH6.5，然后定容到 1L。固体培养基加 15g 琼脂，高压灭菌备用。

20×氮盐储备液：120g $NaNO_3$，10.4g KCl，10.4g $MgSO_4$，30.4g KH_2PO_4，加蒸馏水定容至 1L，灭菌后贮存于 4℃备用。

1 000×维生素溶液：0.01g 生物素，0.01g 维生素 B_6，0.01g 维生素 B_1，0.01g 维生素 B_2，PABA(对氨基苯甲酸)，0.01g 烟酸，加 ddH_2O 至 100ml. 在棕色瓶中于 4℃贮存备用。

1 000×微量元素储备液：80ml ddH_2O，2.2g $ZnSO_4$，1.1g H_3BO_3，0.5g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$，0.5g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$，0.17g $CoCl \cdot 6H_2O$，0.16g $CuSO_4 \cdot 7H_2O$，0.15g $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$，

5g Na_4EDTA。加热煮沸后，冷却至室温，调 pH6.5，定容至 100ml，4℃保存。

(2) 燕麦培养基：燕麦片 30g，琼脂 18g，加水 1 000ml。

方法与步骤：

1. Guy-11 在 CM 平板上 12h 循环光照培养 7 天。
2. 灭菌水洗下孢子。
3. 将孢子悬浮液稀释至 10^3～10^4 个孢子/ml。
4. 取 100 μl 均匀涂于 CM 平板上。
5. 紫外照射诱变。
6. 25℃黑暗培养 24～36h。
7. 将一张灭菌的定性滤纸覆盖其上，并用挑针在平皿边缘刺一小孔。
8. 继续 25℃黑暗培养 36～48h。
9. 将平板上的定性滤纸揭下，覆盖到另一 CM 平板上，并在相同位置刺一小孔，置于 34℃条件下培养 24h。原来的平板置于 25℃黑暗培养(或低于 25℃黑暗培养)。
10. 揭去滤纸，将 34℃条件下培养的平板和原来的平板对比，挑出在 25℃条件下生长而 34℃条件下不长的菌落，转接到一个新的 CM 平板上。
11. 25℃黑暗培养至菌落直径达 1.5cm。
12. 挑取 3mm×3mm 的菌丝块，接种到一个新的 CM 平板上，置于 34℃条件下培养 2 天，菌落直径大于 0.5mm 的，认为是温度敏感型突变体。
13. 保存温度敏感型突变体于滤纸片上。

2 担子菌遗传分析

2.1 概述

担子菌可分为两个主要组群：无隔担子菌和有隔担子菌。对于担子菌的遗传学分析，无隔担子菌主要集中在灰色鬼伞菌(*Coprinus cinereus*)和裂褶菌(*Schizophyllum commune*)，而有隔担子菌以玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)和微葡菌(*Microbotryum violaceae*)等为主。其他无隔担子菌主要进行工业目的研究，如白锈菌(*Phanerochaete chrysosporium*)可以产生漆酶等胞外酶，还有各种风味鲜美的蘑菇。这类真菌可以在非常简单的基质上培养，在实验室条件下几星期可以完成这个生活史。这里的许多方法可以广泛用于担子菌的遗传分析。

2.1.1 生活史

有隔担子菌的生活史从担孢子萌发开始，形成酵母状细胞称为小孢子(sporidia)。而无隔担子菌的担孢子萌发形成同核菌丝体。交配型亲和的两个细胞通过细胞融合，形成双核体的次生菌丝。双核体的细胞内含有两个遗传性质不同的细胞核，这两个细胞核同步分裂，在菌丝生长过程中，通过锁状联合的结构将分裂的细胞核转移到新的细胞中。双核体可以进行有性生殖。在无隔担子菌的双核体菌丝的发育过程中可以形成担子果，在担子果中形成的细胞称为担子的特殊细胞，在担子细胞中，细胞核进行核配，随后进行减数分裂，

然后发育形成担孢子。有隔担子菌如玉米黑粉菌的核配发生在厚壁的冬孢子中，接着进行减数分裂，形成原菌丝(有隔担子)，然后发芽形成单核担孢子(小孢子)。因此，有隔担子菌的双核期在生活史中的时间很短，随即发生减数分裂，在生活史中，单倍体时期在整个生活史中占有主要时期。只有很少的种类(如小密环菌属，*Armillaria* 的种类)营养菌丝的细胞中是倍性的双倍体细胞核。

另外，担子菌还有多种类型的无性孢子，如分生孢子、粉孢子、厚垣孢子，还有菌核结构等特异性结构。

2.1.2　育种

在担子菌中，无隔担子菌的有性生殖过程中不需要同一个种的不同交配型的菌丝进行融合。而有隔担子菌的有性生殖过程必须经过不同交配型的菌株的细胞融合，才能进行核配。不同交配型的菌株在交配型位点上含有不同的等位基因。通过这种方式，远系繁殖得以进行。有隔担子菌种类可以分为两种类型：二极性群和四极性群。二极性群种类如黑粉菌，自身不育性由一个多等位基因位点控制，其减数分裂过程中不同等位基因的分离比率是 1∶1。四极性群种类则有两个不连锁的等位基因控制，减数分裂形成 4 种不同的分离子。

次生的无隔担子类群如 *Agricus bisporus* 可以是二极性，也可以是四极性。在这样的种类中，减数分裂形成的 4 种产物中的两种进入一个担孢子。当两种亲和的交配型的菌丝相遇，则可以发生菌丝融合。因此，这个系统很难进行经典的遗传学分析。

2.1.3　交配型

交配型位点调控有性生殖的过程是高度一致的。调控过程可以分为双核的形成和子实体的发育等不连续的步骤，在玉米黑粉菌中，交配型位点还调控致病性。交配型位点控制着转录因子、信息素和信息素受体的生物合成。一般情况下，控制调节交配形成的转录因子的位点称为 matT 位点，而控制信息素/信息素受体的位点称为 matP 位点。二极性的种类中，这两个位点高度连锁在一起，在减数分裂过程中很难分离。而四极性的种类，这两个位点存在于不同的染色体上。还有其他的交配型位点的分布情况，但主要是这两种情况适合于进行经典的遗传学分析。

2.2　菌株分离

2.2.1　从经过减数分裂的二倍体菌体上分离单倍体

在黑粉菌中，为了获得单倍体的酵母状细胞，首先要收获冬孢子。将发病的寄主组织研碎过滤，在 1.5%硫酸铜溶液中过夜，除去杂质细胞，平铺于营养培养基上，27～32℃条件下培养两天后，冬孢子经过减数分裂，形成原担子并发芽，产生小孢子。然后用无菌水将单倍体的小孢子洗下。然后将收集到的小孢子稀释，按每个培养皿 100 个小孢子的浓度涂于水琼脂平板培养皿上。等到小孢子发芽形成小菌落，则可以将单个菌落转移到新的平板上，获得单倍体菌株。

单倍体菌株可以通过分离丝状的异宗配合菌体上担孢子获得，有时也从次生的同宗配

合的担子菌上洗下担孢子，涂于培养皿上，待担孢子萌发形成单孢子菌落获得。还可以直接从野外的担子菌成熟的担子果中收集担孢子，在实验室中分离获得。在培养担孢子萌发过程中，往往要在平板上加入抗生素防止细菌的污染。一般抗生素的使用浓度为：青霉素 25 000U/ml，链霉素 25mg/ml，新霉素 50mg/ml。在实验室中，担孢子的形成往往需要一定条件的诱发，不同种类条件有所不同。

方案 9　鬼伞菌在人工培养条件子实体和担孢子的产生

仪器与设备：

1. 尖锐的钨针　长约 2～3cm，直径在 0.3mm 的钨针，固定在一个接种针柄上。

2. 25～28℃(40W 左右的日光灯)的光照培养箱，能够进行湿度调节。

3. 顶部有光照的通风箱，底部可以加湿纸巾保湿。

4. YMG 琼脂平板或 YMG/T 琼脂平板(在 YMG 琼脂平板中加入 100mg/L 色氨酸)。

方法与步骤：

1. 将钨针在火焰上烧两次，待针尖冷却后，用钨针从生长旺盛的菌落边缘切下一小片(约 2 mm^2)带培养基的菌落，转移到一个新的琼脂平板上[a]。

2. 至于通风箱中 37℃黑暗培养至菌丝尖端刚刚长到平板的边缘。

3. 将培养皿转移到培养箱中，温度 25℃，湿度在 80%～90%，12h 黑暗/12h 光照循环条件下培养约 1 周左右，子实体会从平板的菌丝体上长出并逐渐成熟[b]。

4. 当子实体盖开裂孢子颜色变黑时，用 1ml 的无菌水将孢子洗下，收集到一个 1.5ml 的离心管中。

5. 镜检孢子浓度，将孢子浓度稀释至约 10^3/ml，取 0.1 ml 均匀涂于一个新的水琼脂平板上。或者在未稀释前存放于 4℃，以备用[c]。

6. 37℃培养孢子 1～2 天。

7. 待孢子萌发形成小菌落时，将带菌落的小琼脂片切下，转移到新的培养皿中继续生长[d]。

注：a. 双核菌丝体非常坚硬，用金属钨做的挑针非常适合切取担子菌的菌丝体。

b. 循环光照、较高的湿度条件，从 37℃到 25℃的温度转换对子实体的产生非常重要。

c. 在 4℃条件下，担孢子可以存放几个月而不影响萌发。

d. 在低倍显微镜下进行单菌落的挑选是常用的方法。

2.2.2　通过双核菌丝的脱双核化分离单倍体菌株

当子实体难以获得或者担孢子不能萌发时，可以通过双核菌丝的去双核化获得单倍体菌株。这个方法的重要性还在于，在一种同宗配合的担子菌中，双核菌丝中的双核不发生融合，但在减数分裂时，不同基因型的担孢子却可以经常融合。以下是去双核化的方法，对于次生同宗配合的种类很有用。

(1) 从一些种类(*C. cinereus*，*Pholiota nameko*)的双核菌丝体产生的无性孢子中分离单倍体无性孢子，并使其萌发见方案 4，有些种类如 *C. cinereus* 等，产孢过程需要进行光诱导。

(2) 对于在双核体上难以产生单倍体无性孢子的种类如 *S. commune*，制作其原生质体并使其萌发再形成菌丝。

(3) 在灭菌的韦氏搅切器中将菌丝体破碎,然后将菌丝平铺在平板上。这是在原生质体不能得到时采用的一种效率不高的替代方法。

(4) 微手术

1) 在隔膜形成后但锁钩状细胞还没有与原细胞融合时,用一个尖锐的微操作针通过穿刺,将生长菌丝的最顶端细胞、亚顶端细胞的下游细胞、锁钩状细胞直接杀死,只留下单核的亚顶端细胞存活生长。由于双核细胞在每一次的分裂过程中,2 个核交替其领先的位置,决定哪个细胞核进入锁钩状细胞,哪个进入亚顶端细胞。通过这种方法,理论上可以得到任何一个单核的菌株。

2) 在固体培养基上分离的 *C. cinereus* 双核的厚垣孢子,以及子实体外围大型细胞在萌发时向两端生长的细胞中,每一个细胞都是单核细胞。在这 2 个细胞重新结合之前,在解剖镜下用挑针将一端的细胞穿刺杀死,就可以分离到单核的菌株。

(5) 在含有亚致死浓度的药剂(如胆盐、牛胆汁、胆酸钠、Cu^{2+}、Zn^{2+}、Cr^{6+}、砷化物)的平板上培养双核菌丝,则可以获得含有抗性较强的细胞核的单核菌丝。

(6) 生长在低磷、低镁,含有 3%～8%甘氨酸或蛋白胨、2%葡萄糖的饥饿培养基上的双核菌丝可导致单核菌丝的向外生长。

2.2.3　通过配合形成双核体

在合适的温度条件下(*U. maydis* 是 32℃,*M. violaceae* 是 15～20℃),在特殊碳源的培养基(*U. maydis*)或水琼脂培养基上(*M. violaceae*),能够亲和的 2 种不同交配型单倍体的小孢子萌发后相遇,可以结合成为双核体。但是,双核体的进一步发育必须是在寄主上进行。为了获得这类真菌的冬孢子,一定浓度的不同交配型单核细胞的混合悬浮液(10^7～10^8个细胞/ml)通过注射进入寄主的节或叶片(*U. maydis* 要处理 4～10 天的幼苗,而 *M. violaceae* 处理幼嫩的植株)。约 10 天后,在寄主发病的肿大部位可以形成冬孢子。此时可以收集冬孢子,在用硅胶作为干燥剂的干燥器中可以保存数年。

实验室中进行交配型测试时,一般是从已经生长好的 2 个单独培养的单倍体菌株的菌落边缘切取小块菌落,放置在 YNG 或其他合适的培养基的平板上对峙培养,2 个不同交配型菌丝块的间隔约 1～2cm。进行交配实验的平板置于合适的温度下培养(*C. cinereus* 约 37℃,虽然有时在较低温度如 24～30℃条件下更有利于交配结合)。随后菌丝融合,双核菌丝可以在 3 个部位长出:交接区域及 2 个交配型菌株的外边缘。在交配过程中,细胞核将发生交换,并通过交配型双方的同核体菌丝(homokaryotic hypha)移动,直到它们在菌丝先端相遇并同步分裂,形成双核体。由于线粒体没有交换,在同核体边缘的双核体将是遗传异质的。在双方交界的部位形成的融合细胞中,线粒体是可以发生融合交换的。由于线粒体可以影响双核体的表型,因此可以从同核菌丝的边缘获得单一线粒体的双核体。但是,有些种类如 *C. cinereus* 的双核体仅在交接部位形成。

2.2.4　特殊遗传条件下的菌株分离

当要对交配型位点的功能进行分析时,常常需要在 1 个交配型菌株或者 2 个交配型菌株中构建异核体,这个异核体包含了原来交配型的遗传信息。一般情况下,异核体很不稳定,需要存在一个选择压力,才能对双核体进行保存。将 2 个不同营养缺陷型标记的菌丝块

置于营养缺乏培养基上，当菌丝融合时，由于融合的细胞中营养缺陷得到互补，因此，可以长出菌丝，形成菌落。对于同宗配合的种类如 *P. chrysogenium*，在不同营养缺陷型菌株之间形成双核体，是经常使用的方法。通过这种方法，异核体减数分裂形成的分离后代在缺乏培养基上可以达到异核体与单倍体营养缺陷型之间的平衡。

在 *C. cinereus* 中，通过收集粉孢子然后铺于营养缺乏培养基上培养，双倍体体细胞可以从有选择压力的条件下分离得到 commonA 和 common AB 异核体。2 个不同的含有一个细胞核的粉孢子可以融合形成异核体，其频率是 10^{-3}～10^{-4}。只有异核体的细胞才能进一步形成菌落。*S. commune* 的双倍体菌丝可以在 common AB 异核体上形成，这样的菌丝中的细胞核含有 2 个营养缺陷型标记。由于这 2 个标记的细胞核在一个细胞中，功能互补，因而可以在营养缺乏培养基上生长。玉米黑粉菌的原养细胞通过在室温或 15℃条件下，将亲和的 2 种交配型的营养缺陷型细胞在交配培养基上培养 24h 后，再涂于营养缺乏培养基上进行选择性分离获得。*U. maydis* 中获得的 a≠b≠双倍体（交配型的 2 个位点都杂合）在炭源培养基上是细丝状；如果用低剂量的紫外辐射（15%～30%存活率）诱变后，菌丝体通过有丝分裂和基因重组，可以形成 a≠b＝双倍体（a 位点杂合）或 a＝b≠双倍体（b 位点杂合），可以在平板上获得一个位点杂合的酵母状双倍体细胞。a≠b≠双倍体和 a＝b≠双倍体称为“solo-致病性”菌体，可以对寄主致病并产生冬孢子而不必经过再与其他菌株交配。在转化时通过同源重组，可以在内源的 b 位点掺入亲和的 b 交配型基因，而获得单倍体“solo-致病性”菌体，这类突变体非常适合于分离致病基因。

在无隔担子菌中，具有交配型缺陷的自身亲和同核体在单倍体条件下，对研究同核体基因在双核体中的功能方面（子实体的形成、减数分裂等）具有特殊意义。这些同核体可以自发突变形成，也可以通过化学物质处理诱变获得。当有正向选择方法时，这样的突变体比较容易筛选得到。含有担孢子的子实体在形成时就带有突变位点。这样的突变很少发生，但对含有突变的子实体采用正向选择方法，还是比较容易筛选获得的。突变发生在两个不同位点时，可以通过共培养这 2 种菌株，在含有交配型信息的突变体上可以形成子实体。可以采用只对一个位点有选择标记的培养基产生担孢子，在不同的选择培养基上独立筛选获得突变体。在不同位点突变的不同突变子的细胞核在交配过程中能够在同一个细胞中发生融合。在 *C. cinereus* 和 *S. commune* 中，交配型的 2 个位点的突变体都可以获得。由于位点 A 的基因和位点 B 的基因都可以进行 DNA 转化，也可以在转化中通过染色体整合而获得交配型基因突变体。

2.2.5 分离培养物的保存和维持

由于长时间培养可以积累自发突变而造成基因型的改变，因此，当筛选到有意义的突变子或者从其他实验室获得后，要尽快准备冻存培养物。酵母状细胞，例如玉米黑粉菌的液体培养物，可以用灭菌甘油稀释 15%～30%，然后存放于－80℃。在这种条件下，培养物可以保存相当长的时间，并且复壮时所需要的菌体很少。担子菌的菌丝体，先在平板上充分培养，然后分成小块，将 15～20 块小菌块放到含有 1ml 15%甘油的灭菌水的 2.5ml 冻存管中，存放于－80℃。复壮时，先将冻存管解冻，然后将含甘油的液体去除，所有的菌丝块都转移到平板上培养。实验表明，复壮 *C. cinereus* 时也可以只取出一至几块菌丝块进行培养复壮。工作培养物可以连续使用几个月，时间的长短根据突变体的稳定性具体而定。

2.3　遗传互补

在黑粉菌中，遗传互补研究是通过在交配培养基上交配，然后在选择培养基上筛选双核体菌株，通过对双核体表型是否产生了功能互补的表型来进行的。在四极体类型的 *U. maydis* 中，营养缺陷性标记必须都有不同的 a 交配型位点（控制细胞融合）菌株，而特异的 b 交配位点（控制致病性和融合以后的交配事件）可以相同，也可以不同。在无隔担子菌中，菌丝融合与交配型是各自独立的事件，代谢缺陷的互补研究可以通过双核体进行，也可以通过在选择条件下的异核体进行。不论在自身亲和的 AmutBmut 菌株是否有发育缺陷，都可以通过有代表性的 AmutBmut 突变体菌株来建立。

2.4　遗传图谱

在 *C. cinereus*、*Schizophyllum commune* 和 *M. violaceae* 中，通过有性和准性遗传重组，已经获得了很精细的遗传图谱。在 *C. cinereus* 有 108 个遗传标记，在 *Schizophyllum commune* 中有 66 个遗传标记，在 *M. violaceae* 中有 43 个遗传标记，遗传标记分布于不同的染色体上。虽然经典遗传学的前期重要工作已经进行，但是通过突变体分析进行遗传学研究还是很有价值的。一些很好的遗传分析方法能够大大降低筛选突变体的工作量，而且新的方法给经典遗传学提出了新的任务。

2.4.1　通过有性重组绘制遗传图谱

经典的遗传图谱运用突变体和野生型菌株杂交。在多数担子菌中，2 个遗传标记的重组率能够反映这两个标记之间的连锁距离。重组后的基因通过杂交，在有性生殖产生的后代中随机分离。一般情况下，在分析分离后代中表型标记的分布时，可以先将担孢子放在非选择性培养基上萌发。对于形态学标记，菌落可以直接进行分析。由于含有营养缺陷型标记或抗性标记，将后代菌落转移到选择性培养基上，或置于选择性培养条件下培养（对于环境条件致死性突变体），或者当研究形态缺陷如子实体发育缺陷等标记时，将待测菌落在非选择性条件下和选择性条件下平行培养，然后对比观察在 2 种条件下的表型特征，是获得两个标记在杂交后代中的分布率的最简洁快速的方法。当亲代的表型比例明显大于非亲代的表型比例时，说明两个标记之间是连锁的。在不连锁的情况下，双亲表型和非双亲表型的比例大体相等。

在担子菌的遗传杂交过程中，被测菌株的遗传背景常常被忽略。由此带来的结果是，偏离的孟德尔遗传分离按正常的进行了记录。例如有些是因为转化或突变造成的影响，亲代菌株在杂交后，不同基因型子代的孢子萌发率不同，会造成测定基因分离频率时出现偏差。为了避免在以后的分析中出现不必要的误差，理想的经典遗传分析采用共分离的菌株进行。共分离菌株通常是经过对一个特定亲代进行重复回交获得。回交的次数可以用以下的公式估计（Leslie 公式）：

$C(n) = 2c(1/2)^n = c(1/2)^{n-1}$。其中 $C(n)$ 是一个菌株中还有的异源发生的染色体的平均数，c 是单倍体染色体数目，n 是回交代数。

这个公式表明，一个菌株的单倍体细胞中的染色体数目决定了回交的次数。

2.4.2 电泳核型和 RFLP 分析

电泳核型技术现在也用于辅助绘制遗传图谱。经典的遗传分析只能对有标记基因的染色体进行分析，而核型鉴定可以知道染色体的绝对数量。一般情况下，同一个种的不同分离物的同源染色体的长度不是完全相同的。这些在后代中的长度多态性可以用 CHEF 凝胶电泳检测。对能够表现表型特征的菌落来讲，在单个染色体上存在的表型标记可以连续应用。相对于通常情况下需要对第一次杂交的后代进行大量分离分析，通过突变后代对野生型亲代重复回交，可以非常有效地减少变异染色体的数目。每一次回交都可以消除一些原先突变存在的变异染色体数目。最好的情况是，在突变体后代和野生型菌株之间只有一条染色体不同。这条变异的染色体或者是从原始突变菌株传递过来的，或者是通过 2 个菌株的染色体重组得到的。需要进行回交的次数要依赖于出发菌的绝对染色体数目。例如，*C. cinereus* 含有 13 条染色体，*S. commune* 含有 11 条染色体，一般 3～4 次回交就足够了。这种方法对减少变化的染色体数目很有效。

方案 10 通过 CHEF 凝胶电泳分离 *C. cinereus* 的染色体

设备与试剂：

1. CHEF 电泳系统(Bio-Rad 公司)，包括一个 Bio-Rad 12.7cm×14.0cm(5 英寸×5.5 英寸)英寸的制胶模具和形成加样栓的模具，一般要在一个冷房间中装配。

2. 接通电泳槽的冷却水。

3. 带正电的杂交膜。

4. MM 缓冲液 新鲜配制，用 2 体积的灭菌 1mol/L 甘露醇，1 体积 0.2mol/L 顺丁烯二酸盐(或酯)pH5.5，1 体积的灭菌水配制。

5. 原生质体，在 MM 缓冲液中的浓度是 6×10^8/ml。

6. 用 MM 缓冲液配制的 2%低熔点琼脂糖胶，保持在 50℃。

7. Tris-EDTA 溶液 0.01mol/L Tris-HCl pH9.5，0.3mol/L EDTA，过滤，灭菌。

8. NDS 用 Tris-EDTA 溶解 2% N-月桂酰肌氨酸(N-lauroyl sarcosine)和 1mg/ml 蛋白酶 K，现配现用。

9. TBE 45mmol/L Tris 碱，45 mmol/L 硼酸，1.25mmol/L EDTA pH8.3。

10. Bio-Rad 染色体梯度琼脂糖(用于 3～4Mb 大小的染色体)或者 Beckman LE 琼脂糖(用于 1～2Mb 大小的染色体)。

方法与步骤：

1. 加样栓的准备

(1) 将原生质体与琼脂糖溶液按 1∶1 的比例混合，立即加到加样栓的模具中，在 4℃冷却 20 min。

(2) 用金属抹刀将加样栓转移到空的培养皿中，用 NDS 溶液完全覆盖，在 50℃保温 24h。

(3) 用 20ml 的 Tris-HCl 去掉 NDS，将处理好的加样栓保存在 4℃备用。

2. 凝胶的准备

(1) 在制胶模具中用 0.5×TBE 配制琼脂糖凝胶(1%，*W*/*V*，Beckman 琼脂糖或者 0.9%Bio-Rad 琼脂糖)140ml。

(2) 将琼脂-原生质体加样栓(6mm×9mm)加到上样孔中，用 1%低熔点琼脂糖凝胶封住。

(3) 在凉爽的房间中，用 CHEF-DR Ⅱ 电泳槽进行电泳，电压 60V，用 0.5×TBE 电泳缓冲液，22min/次电脉冲，电泳约 6 天。

(4) 电泳期间保持电泳槽温度在 14℃，循环水温度在 4～9℃。

(5) 每天更换 1 次电泳液。

(6) 电泳结束后，用 0.5μg/ml 的溴化乙锭染色 1h，照相。

(7) 如果 Southern 杂交已经准备就绪，将染色体转移到杂交膜上，用合适的基因探针进行杂交。

通过电泳分离染色体，采用 Southern 杂交的方法，可以得到某个基因是否定位于那条染色体上的信息。但是，这种技术不能告诉我们目的基因与已经知道的同染色体上的标记的遗传距离。为了知道目的基因在该染色体上的确切位置，用含有标记的菌株与带有目的基因的菌株进行杂交就势在必行。传统上，遗传图谱的制作要求不同的基因位点通过杂交产生不同的表型。在构建遗传图谱过程中可以选用许多这样的标记，这些标记绝大多数来自 20 世纪 60～70 年代，其模式培养物保存在如 ATCC 等保藏机构，可以从这些研究保藏机构获得。或者可以从最初的研究者的实验室获得。当然，也有一些经过多年已经丢失。但是，分子标记可以用 RFLP 比较容易地得到。分子标记可以进行遗传连锁研究，进而制作物理图谱。当遇到连锁很近的基因位点，这个信息可以通过染色体步行的方法克隆目的基因。真菌基因组计划的实施，为物理图谱的构建提供了坚实的基础。

2.4.3　四分体分析

四分体分析比随机孢子分析有许多优越性。孢子生活力缺陷比较容易得到检测，需要分析的后代数目也可以大大减少。而且，在顺序确定的四分体中进行连锁分析时，中心体作为另外的标记，可以显示在经过第一次分裂或第二次分裂后，遗传标记是否已经分离。然而，担子菌中的四分体通常不能确定其顺序，因此，孢子重排不能得到关于减数分裂模型的任何结论，通常还是要进行两个标记之间的遗传分析。

在玉米黑粉菌中，无序的四分体分析很容易进行，因为冬孢子很容易分离。将合适稀释度的孢子溶液涂于固体培养基上，在显微镜下，用一只很细的挑针就可以进行小孢子的单孢分离。或者可以将一定稀释度的小孢子悬浮液涂于新鲜固体培养基上培养，使其形成单孢菌落。形成的菌落可以通过表型的比例进行遗传分析。一旦一个标记可以确定在着丝粒附近，它就可以作为一个特定着丝粒的指示。在 *M. violaceae*，菌落颜色基因家族标记分布在着丝粒附近，使半四分体分析可以很容易地进行：冬孢子可以直接涂于选择性培养基上，使四分体担孢子中的 2 个孢子发芽，正常颜色的菌落显示第一次减数分裂的分离，选择性菌落代表第二次减数分裂事件。在亲代菌落和非亲代菌落的平均比例代表 2 个分子标记的独立分离。任何显著性的偏离(方差)代表了颜色标记和第二个标记之间的连锁距离。冬孢子菌落中混合颜色菌落比例可以估计与着丝粒连锁的标记的频率，通过公式$(T/2)/N\times 100$ 来计算。其中，T＝四分体表型的数量的绝对值，N＝菌落数量的绝对值。

在绝大多数的无隔担子菌中，在减数分裂过程中的遗传特点只能通过将孢子悬浮液涂于萌发培养基上，然后采用随机孢子分析的方法进行研究。但是，由于孢子体积相对较大，同型核配和在一个特定的子实体中的减数分裂和黑色孢子色素形成显示的突变，在

C. cinereus 中采用显微手术分析四分体的操作是可以进行的，*C. cinereus* 菌盖自行溶解时表示子实体已经成熟，这个快速过程可以通过转移子实体到 4℃而阻止。而且单个菌褶在需要时可以转移到合适的条件下，以备随后的实验要求。

方案 11　*C. cinereus* 的四分体分离

设备与试剂：

1. 具有 10×物镜和 16×目镜的显微镜，附有微手术操作台。
2. 用灭菌的抹刀从 10ml 的 YMG(4%琼脂)固体培养基上切取 0.5cm^2 琼脂凝固片。
3. 分别适合显微镜分离室大小的灭菌的载玻片。
4. 用直径 3mm 的玻璃棒制成的玻璃针，固定到微手术台上。
5. 支持载玻片的培养皿，并有一层硅胶。

方法与步骤：

1. 用灭菌的镊子伸到 2 层菌褶中，将菌褶撕开，有孢子的一面向上，放到显微镜载玻片的一端，使其干燥。
2. 用微手术挑针刮擦子实层，使孢子分散到载玻璃片上[a]。
3. 将载玻片放到含有一层干燥硅胶的培养皿中快速干燥，使四分体的 4 个孢子分离。
4. 在含有硅胶的干燥器中室温保存带有子实体的载玻片[b]。
5. 需要时，用微手术操作挑针直接从子实体上，或者从载玻片上取下四分体孢子，转移到琼脂凝固片上，将琼脂凝固片放置在一个载玻片的一端。
6. 将琼脂片上的一个四分体的 4 个孢子，在微手术台上，或在显微镜下，直接用一个合适的玻璃针将 4 个孢子分离。
7. 将分离的孢子在 37℃过夜培养，使其萌发。然后，用钨针将发芽的孢子转移到新的平板上继续培养。

注：a. 在很多情况下，铺展在载玻片上的孢子群体往往整个四分体聚集在一起。

b. 载玻片可以保存几个月，孢子也不会萌发。

2.4.4　用准性生殖构建基因图谱

准性生殖循环包括双倍体细胞的产生，有丝分裂重组产生双核分离子，再经单核化或者非整倍分离。在实验室条件下可以进行减数分裂的种类，准性生殖可以进行连锁分析，但一般不需要。相反，对于不容易进行减数分裂的类群，其营养菌体又很发达，如 *Armillaria mellea*，采用准性生殖重组的方法是进行遗传分析的有效途径。在一些种类中(*M. Violaceae*)，双倍体核通过有丝分裂发生交叉交换的频率是 5%，在其他种类中，有丝重组可以通过低剂量的紫外线照射加以提高。为了选择用于双倍体重组事件，往往要用低剂量的紫外辐射进行单核化诱导。或者用 0.3mg/L p-氟苯丙氨酸，9～15mg/L 噻苯达唑(thiabendazole)，25μg/L 苯来特(benomyl)，20mg/L 灰黄霉素或其他化学物质处理，标记基因之间的连锁分析过程如同子囊菌遗传分析方法。

双核的无隔担子菌具有提供育性和给单倍体同宗配子而产生新的双核体的能力。这个过程称做“Buller 现象”，在“非嫡出的”双核-同核交配系统中，同核体的单倍体核与双核体的每一个细胞核只有半亲和性，也可以用作准性遗传分析。单倍体核与双核体共用一个

细胞核，即特异的 A，并且可以与特异的 B 交配型作用。在这种“非嫡出的”交配中，双核体是同核体被一个另外的交配型不同的细胞核的入侵中产生，显示在原先的双核体中存在有短暂的双倍体和有丝分裂重组的阶段。新交配型的特异的重组核一般包含有来自双亲的另外的标记，类似地，在 *Armillaria gallica* 单倍体和双倍体菌株中，重组细胞核带有同等或不等的来自单倍体和双倍体双亲的基因。

2.5　自然突变体

在进行发育过程研究时，例如子实体的形成，从野生型分离各种菌株是非常有用的方法。在 *C. cinereus* 中，4 种在子实体发育过程中起作用的基因从只有 11 个野生型菌株的很小的群体中分离出来。这些基因的隐性位点导致子实体发育缺陷，在自然群体中明显存在，由于在 1 个子实体中的突变后代，在双核体中有很高的位点互补机会而得不到表现。从野外的 1 个子实体中的后代中分离的发育突变体，称为 ich1，是由于一个控制菌盖发育的重要基因突变形成的。另一个从野外分离的菌株，CopD5-12，提高了同核体细胞，是由于它有一个同核子实体的特性，是由于基因 *pcc*1 编码 HMG 盒转录因子的隐性突变造成的。

2.6　经典突变

在担子菌中，经典诱变的一般方法（方法、获得的突变体的类型）与子囊菌和其他有机物的诱变策略相同。任何类型的诱变最好用单核细胞进行。异隔担子菌很容易得到酵母状单倍体。在丝状的 *C. cinereus*，可以应用单倍体的粉孢子。对于同隔担子菌，缺乏有丝分裂产生的孢子，但可以在培养基上产生子实体，用担孢子可以部分地克服这个问题。当从一个 Amut Bmut 同核菌株上获得担孢子，孢子甚至是遗传同质的。但是，杂合种类的担孢子由于有丝分裂后的减数分裂，经常是双核的，因此具有很强的色素或者非渗透性的厚细胞壁，因此，担孢子在诱变前需要孢子萌发。

菌丝诱变方法经常应用 2 种诱变起始材料：一是应用在液体培养基培养获得的菌丝小球通过涡轮搅拌破碎后的菌丝片段；二是应用原生质体。破碎的菌丝往往是多细胞的，应用受到一定的限制，原生质体每个细胞含有 1 个细胞核，是一个很好的选择。当用于诱变的合适孢子不能获得时，就用原生质体。

2.6.1　紫外诱变

紫外诱变可以用开放的紫外光照系统，研究者可以随意开关紫外灯，但要避免紫外线直接照射科研人员。为了确保紫外辐射的精确剂量，可以用紫外辐射探头检测。紫外辐射一般在一个辐照室（箱）中进行，辐照机械配备有一个内部测光探头，是为了补偿紫外灯管老化造成的输出减少而设计的。在进行大量紫外诱变之前，确定菌株辐射层剖面对紫外线的敏感性是非常重要的。被试菌株在各种辐射剂量和存活率条件下的菌落形成单位（colony-forming units）需要确定。*C. cinereus* 的粉孢子常常是 10%～20%的萌发率，我们应用杀死率为 90%的能量剂量，最终的萌发率是 1%左右。

方案 12　*C. cinereus* 粉孢子的紫外诱变

设备与试剂：

1. 生长在 YMG 培养基或 YMG/T（YMG 培养基加 100mg/L 色氨酸）上的 37℃培养

菌落平板[a]。

2. 灭菌的曲颈漏斗，底部有一层玻璃绒，出口处连接着用棉绒塞封的玻璃试管。

3. 血细胞计数板。

4. 新制的 YMG 或 YMG/T 培养基平板。

5. 在内部顶部装有紫外灯的辐射箱(一般自制)。

方法与步骤：

1. 在生长好的培养物上倒入 10～15ml 的无菌水，用刮刀刮擦气生菌丝表面，收集粉孢子。

2. 用酒精灯火焰轻烤步骤 1 中的平板边缘，然后将孢子倒入漏斗中，以分离粉孢子悬浮液。

3. 用血球计数板检查孢子浓度，并调整孢子浓度到 10^5/ml。

4. 将(3～10)×10^3个孢子转移到新鲜培养基中[b,c]。

5. 将含有粉孢子的培养皿开盖，放到紫外辐射箱中。

6. 打开紫外灯，用辐射能量在 10～20mJ/cm^2进行处理[d]。

7. 关闭紫外灯，将培养皿的盖子盖上，移出辐射箱，直接置于培养箱中，暗处培养[e]。

8. 在 37℃下培养 2 天后，将培养皿取出，用钨针将菌落转移到新的平板上，继续培养。

注：a. 在双核体的 Amut Bmut 菌株中，粉孢子的产生需要光诱导。将长满菌落的平板转移到连续光照的条件下 37℃培养 2～4d(光照强度在 20～25$\mu Em^{-2}s^{-1}$)。

b. 不要将细胞铺在固体培养基上，因为可能应用选择突变富集技术(2. 6. 3 部分)。在一个灭菌的培养皿中对一薄层细胞悬浮液进行诱变，诱变后转移孢子悬浮液到合适的液体培养基中。

c. 如果是选择特异抗性突变体，特殊的物质可以加到培养基中，其浓度达到抑制野生型菌株的生长。

d. 这些能量剂量对 *C. cinereus* 可以达到 90%的死亡率，每个培养皿可以达到 10～100 个存活菌落。

e. 在黑暗处进行这个步骤非常重要，可以防止诱发有机体的 DNA 修复系统。

2.6.2 化学诱变

DNA 烷基化化学物质，例如 N-甲基-N′-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)和甲基丙烯硫磺酸(EMS)等物质，主要有提高碱基对替换和 DNA 缺失的作用和导致 DNA 氧化去氨基和交联作用，已经用于担子菌的诱变研究。就像紫外诱变一样，在设定细胞浓度之前，确定一定剂量下真菌的孢子或原生质体或菌丝球对化合物和处理时间的反应的存活率是必要的，以便在诱变过程中获得可以方便工作的真菌细胞存活数。由于这些化学物质在应用时具有亲脂性的特点，准备原生质体进行诱变可以提高效率。注意，诱变剂往往被看作是潜在的致癌物质，因此在操作过程中要注意合适地防范。

方案 13 利用 NTG(MNNG)/EMS 对担子菌进行诱变

试剂设备与试剂：

1. 在透明的圆锥形离心管中将孢子或菌丝球用无菌水调节到在合适的浓度，或者原生质体用灭菌的 MM 缓冲液调节到合适的浓度，然后放到台式离心机上。

2. 无菌水和灭菌的 MM 缓冲液。

3. NTG(MNNG)(Sigma 公司产品，用 0. 2mol/L 的柠檬酸溶液 pH5. 0 或 MM 缓冲液稀释到 1mg/ml。现配现用)或者液体 EMS[a]。

4. 新鲜的固体培养平板和灭菌的液体选择性培养基[b]。

方法与步骤：

1. 在孢子悬浮液中加入 1ml 的 MNNG 或者使终浓度达到 1%～4%的 EMS[a]。

2. 室温下培养，并经常轻轻晃动[c]。

3. 对处理后的孢子悬浮液高速离心 5min，收集沉淀[d]，将上层液体回收处理[e]。

4. 用灭菌水或者 MM 缓冲液漂洗细胞，再离心，去掉上层液体[e]。

5. 将沉淀的细胞重新悬浮在 200～500μl 灭菌水或者 MM 缓冲液中，然后涂到固体培养基平板上[f]。

6. 在合适的温度下培养，直到有小的菌落长出（直径 1～2mm）。

7. 用挑针分离菌落到新鲜平板上继续生长[b]。

注：a. 在对试剂进行操作时，戴上口罩和一次性手套。

b. 如果筛选抗性突变体，特殊的物质可以加到培养集中，其浓度要达到可以抑制野生型菌株生长的剂量。

c. MNNG 的处理时间为 1～3h，EMS 的处理时间为 4～12h。在 EMS 处理时间结束时，在诱变体系中加入 5%（W/V）$Na_2S_2O_3$终止反应。

d. 在 2 600g 的离心力下离心 5min，沉淀孢子或菌丝球。原生质体的离心力要低，如可用 640g 离心 5min。

e. 收集所有被诱变剂污染的材料（器具、溶液等）于一个容器中，焚烧处理。

f. 如果要富集处理，在操作步骤 3 时，用液体培养基代替固体培养基平板。

2.6.3　突变子的筛选

无论是紫外诱变还是化学诱变产生的突变，筛选突变子的程序是一样的。一般来讲，表型不稳定的、容易发生恢复突变的突变子要避免继续分析，表型突变明确的突变子才值得进一步研究。

2.6.3.1　形态和发育突变体

细胞形态和菌丝形态或（和）生长缺陷的突变子能够通过在固体培养基平板上的菌落外观或者生长习性的改变而很容易进行检测。筛选非必须发育途径的突变子或者致病性的突变通常是比较费时、费力的工作。例如，玉米黑粉菌的单基因致病性单核突变体需要对突变子逐个进行致病性测定。类似地，数千个 *C. cinereus* 的 Amut Bmut 同核突变子和其他的同核子实体逐个置于昼夜交替的 25～28℃条件下来检测子实体起始和发育过程中的变化。分生孢子形成缺陷突变体通过菌丝体形态的改变来鉴定。但是，如果孢子是无色的，象粉孢子，孢子平板印迹方法有助于发现影响产孢的突变。

2.6.3.2　平板印迹

对于需要在特定条件下对生长的大量突变体进行筛选，或者要筛选温度敏感性突变体，而突变体的菌落是酵母状，则平板印迹是一个有用的方法。下面给出了一个常用的操作程序。同样的技术也可以用到其他丝状担子菌的由菌丝体形成的菌落筛选中。但是 *C. cinereus* 的孢子也黏附在金属表面，能够用微量滴定板进行印迹，也可以用商用多钉复印器，安装上短粗的钝头钉进行。真菌菌落的平板印迹在大量菌落存在时是非常有用的（50～500），在培养基中添加特殊物质（山梨糖等）或者蔗糖可以减少菌落的直径（水平生长）而增加菌落的厚度（向上生长）。

方案 14　平板印迹

设备与试剂：

1. 方形的绒布(约 15cm×15cm,边缘翻进锁边),用锡箔包扎、灭菌。

2. 一个木制、塑料或金属圆形模块,可以放进培养皿中。

3. 一个橡皮圈或者 O 形环,比模块稍大。

4. 在平板上生长良好的菌落以及含有选择性培养基的新制平板。

方法与步骤：

1. 用记号笔在需要印迹的平板和新制平板的底部或边缘做上标记。

2. 用绒布覆在模块上,并用橡皮筋或者 O 形环扎紧。

3. 将长好菌落的平板反扣在扎有绒布的模块上,使菌落印在绒布上。或者相反,将扎有绒布的模块反扣在长好菌落的平板上。

4. 将长有菌落的平板取下,并将一个新制的平板覆盖在模块的绒布上,使菌落印到新制平板上。注意要在与原平板相同的位置做一个记号。

5. 在合适的培养条件下培养经过印迹的平板,并且经常与原平板比较,检查长出的菌落和没有生长的菌落。

2.6.3.3　过滤富集和通过选择性杀死富集突变体

过滤富集技术对于选择性地去除诱变后的原养型菌落是一个非常有用的途径,例如,*C. cinereus* 的粉孢子及 *S. commune* 的担孢子的诱变。诱变后的孢子在萌发液体培养基(如含有少量特殊炭源的营养贫乏培养基)中培养,原养型粉孢子或担孢子可以生长,而营养缺陷型突变体则不能生长。萌发形成的菌丝通过过滤培养悬浮液将菌丝与孢子分离(一般用玻璃绒作为滤层),这个过程在通过将孢子涂在含有完全营养的平板上恢复之前,可以间隔一定时间重复进行。

环己酰亚胺是一个蛋白质合成抑制剂,严重影响正在分裂的细胞的存活力,但对于不分裂的细胞影响很小。这样,一个可以对紫外线敏感的突变体和营养缺陷型突变体富集 800 倍的可行方法是:在诱变后的 *S. commune* 菌丝球培养液中添加 100μg/ml 环己酰亚胺。这个方法还应用到对酵母菌的诱变中,显示这种方法可以广泛应用到真菌的诱变过程中。选择性地杀死原养型细胞是通过用细胞壁降解酶(终浓度为 0.5%β-葡萄糖苷酸酶)攻击正在生长的细胞,从而实现对突变体的富集目的,如在 *U. hordei* 中已经应用。其他的选择性杀死策略还有应用真菌抗生素如制霉菌素、*N*-糖基多真菌素、特异性双突变的饥饿筛选法等,在子囊菌中已经建立,但在担子菌中没有得到广泛应用。

2.6.3.4　抑制性选择突变体

许多物质可以阻止特异的代谢途径和细胞功能,这种特性已经用于抗性突变体的筛选。在 *C. cinereus* 中,包括氟乙酸盐[脂]、氟基吲哚、环己酰亚胺、特殊的糖类、荧光增白剂、细胞分裂抑素 E、咖啡因在内的许多物质已经应用。在酵母 *S. cerevisiae* 中已经明确的对其代谢靶点和细胞靶点的有抑制作用的物质,以及在药物研究中应用的许多其他物质也可以在担子菌的选择性筛选中应用。抑制性选择的基本规律是在生长培养基中增加抑制物质的浓度,使其达到对没有突变的生长菌落具有毒性或抑制生长的水平。这样,在应用

这样的物质之前，要通过一系列的抑制浓度梯度确定野生型菌株对这些物质的忍受浓度。如果已知野生型菌株对一种特定物质的忍受性，就可以筛选过敏感的突变体，这种突变体在野生型菌株可以忍受的浓度下不能生长。

诱变剂处理可以暂时抑制萌发和生长，并且一些突变子需要一些时间后才能充分表达其表型特点。因此，诱变后和抑制筛选前添加一个繁殖步骤是至关重要的。这个步骤可以是在涂到固体选择培养基上之前，先在非选择性液体培养基中进行短时间培养。另外，先将细胞涂在非选择性固体培养基上再诱变(如用紫外辐射诱变)，或者在诱变后将细胞涂在非选择性固体培养基上进行短时间培养，然后在其上再覆盖一层含有选择性抑制剂的软琼脂层。每个培养皿需要 4～5ml 灭菌的处于融化状态的软琼脂(0.9%)，软琼脂放在试管内，置于稍高于凝固点的温度(40～42℃)中备用。

附：担子菌研究中的标准培养基

1. 黑粉菌生长培养基　10g 酵母浸出物，20g 蛋白胨，20g 葡萄糖，10～20g 琼脂，加水至 1L。

2. 黑粉菌完全营养培养基　1L 中含 10g 葡萄糖，1.5g NH_4NO_3，2.5g 酪蛋白水解物，0.5g DNA，1g 酵母浸出物，10ml 维生素溶液，62.5ml 盐溶液，用 NaOH 调节 pH7.0，加入 2%的琼脂。

(1) 维生素溶液：1L 中含 100mg 维生素 B_1，50mg 维生素 B_2，50mg 吡哆醇，200mg 泛酸，500mg 对氨基苯甲酸，200mg 盐酸，200mg 氯化胆碱，100mg 肌醇，过滤灭菌。

(2) 盐溶液：1L 中含 16g KH_2PO_4，4g Na_2SO_4，8g KCl，4g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，1.32g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$，8mg 微量元素溶液，过滤灭菌。

(3) 微量元素溶液：1L 中含 60mg H_3BO_3，140mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$，400mg $ZnCl_2$，40mg $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$，100mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$，40mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$，过滤灭菌。

3. 黑粉菌少量营养培养基　1L 中含 10g 葡萄糖、3g 硝酸钾、62.5ml 盐溶液，用 NaOH 调节 pH7.0。

4. 黑粉菌结合培养基　在黑粉菌完全营养培养基或者 2%水琼脂培养基中添加 1%活性炭。

5. YMG 培养基　1L 中含 4g 酵母浸出物，4g 葡萄糖，10g 麦芽浸出物，10g 琼脂。

6. CYM 培养基　1L 中含 2g 蛋白胨，2g 酵母浸出物，20g 葡萄糖，0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.46g KH_2PO_4，1g K_2HPO_4，10g 琼脂。

7. 标准 *Coprinus* 少量营养培养基　1L 中含 25ml A 贮备液，1ml B 贮备液，10ml C 贮备液，2g 天冬酰胺，10g 葡萄糖，10g 琼脂。根据需要，可添加 100mg 氨基酸。

(1) 贮备液：1L 中含 40g KH_2PO_4，90g Na_2HPO_4(脱水)，11.6g Na_2SO_4，20g 酒石酸二氨。保存时加入超过 5ml 的氯仿。

(2) 贮备液：1L 中含 40mg 维生素 B_1，4℃贮存。

(3) 贮备液：1L 中含 25g$MgSO_4 \cdot 7H_2O$。保存时加入超过 5ml 的氯仿。

8. 标准 *Schizophyllum* 少量营养培养基　1L 中含 0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.46g KH_2PO_4，1g K_2HPO_4，20g 葡萄糖，120mg 维生素 B_1，2g 天冬酰胺，12g 琼脂。

第五章　丝状真菌的基因组分析

1　概述

一般来说，丝状真菌基因组分析是一个非常广泛的话题；到目前为止，利用多种技术对基因组进行分析和操作，已经使分离、克隆单个基因成为可能。在本章中，着重介绍对染色体或者是较大染色体片段的操作，遗传图谱、物理图谱的构建及 BAC 文库的构建等。

2　遗传图谱

对于丝状真菌基因组的分析，构建遗传图谱非常有效，可以通过遗传重组得到基因组的信息，分析基因在具体染色体上的线性排列。也可以定位重要染色体上的标记，例如端粒、着丝粒和核仁组成区等。在构建图谱的过程中，还可以研究基因组或者基因的进化。总而言之，遗传图谱在分子生物学的很多方面都有实际的应用，在定位克隆基因、BAC 文库构建、cosmid(黏粒)文库等各个方面都有作用。

2.1　分子标记和基因组分析

绘制遗传连锁图的方法有很多，但是在 DNA 多态性技术未开发时，鉴定的连锁图很少，随着 DNA 多态性的开发，使得可利用的遗传标志数目迅速扩增。使用的多态性标记有 RFLP(限制性酶切片段长度多态性)、RAPD(随机引物扩增多态性 DNA)、AFLP(扩增片段长度多态性)和微卫星 SSR(simple sequence repeats)分析等。

2.1.1　通过 RFLP 标记构建遗传图谱

限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism，RFLP)技术的原理是检测 DNA 在限制性内切酶酶切后形成的特定 DNA 片段的大小。因此，凡是可以引起酶切位点变异的突变如点突变(新产生和去除酶切位点)和一段 DNA 的重组(如插入和缺失造成酶切位点间的长度发生变化)等均可导致 RFLP 标记的产生。

一般选择单拷贝探针。但如果 RFLP 探针是来自拷贝数可变串联重复(varible number of tandem repeats，VNTR)，则产生另一类因相同或相近序列的拷贝数变化所引起的多态性。凡是引起重复单位的大小和序列不同、基因组中重复的数目和分布不同等均可导致这种多态性的产生。在 RFLP 技术中有特殊用途(成为分子标记)的重复序列包括：

(1) 小卫星(minisatellite)序列：重复单位(motif)含有碱基 10～60 个(也有 16～100 个碱基一说)，在基因组中多次出现。

(2) 微卫星(microsatellite)或简单重复序列(simple sequence repeats，SSR)：重复单位含有 1～5 个碱基。

方案 1　克隆固定大小的基因组 DNA 作为 RFLP 探针

试剂：

1. PCI　酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)。

2. CI　氯仿/异戊醇(24∶1)。

3. 1×上样缓冲液　TE 缓冲液中加入 0.04%溴酚蓝，5%甘油。

4. 10×冷冻培养基　44%甘油，0.36mol/L K_2HPO_4，0.132mol/L KH_2PO_4，17mmol/L 柠檬酸，4mmol/L $MgSO_4$，68mmol/L $(NH_4)_2SO_4$。

方法与步骤：

1. 根据质粒图谱，选择在质粒的多克隆位点上存在酶切位点的限制性内切酶，消化 2μg 质粒 DNA，通过转化大肠埃希菌检测酶切是否完全。

2. 用碱性磷酸酶(CIP)处理酶切的 DNA，方法根据 CIP 的说明书。反应液用氯仿抽提，去除蛋白，再经乙醇沉淀 DNA，最终用 TE 缓冲液溶解，调节浓度到 0.2μg/μl。

3. 用步骤 1 中相同的酶，酶切 5～10μg 基因组 DNA，约 100ng 每管分成几等份，通过电泳检测酶切效果。用 0.5×TBE 配制 0.7%琼脂糖凝胶，沉淀用 20μl 1×上样缓冲液溶解，加入点样孔。用 1kb 的 Marker 作为标记，1V/cm 电泳 24h。

4. 用 5μg/ml 的 EB 溶液染色 30min。在 312nm 的紫外灯下观察电泳结果。酶切的片段分布在 5～10kb 之间的范围内。

5. 用 Qiagene 的胶回收试剂盒纯化 DNA。

6. 取 0.5μg 固定大小的 DNA 与 1μg 质粒 DNA 连接，体系不大于 10μl。取 1μl 连接反应液，电击转化大肠埃希菌。

7. 次日，挑取单菌落，接种到含有 1×冷冻培养基、抗生素的 LB 培养基中。37℃轻摇，过夜。接下来，用复制工具将菌落涂到尼龙膜上(方案 10)，－80℃保存。

2.1.2　RAPD 技术

RAPD 技术的全称是随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA)，此技术建立于 PCR 基础之上，使用一系列具有 10 个碱基的单链随机引物，对整个基因组的 DNA 进行 PCR 扩增，以检测多态性。每一随机引物单独进行 PCR。引物结合位点 DNA 序列的改变以及两扩增位点之间 DNA 碱基的缺失、插入或置换均可导致扩增片段数目和长度的差异，经聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离后通过 EB 染色以检测 DNA 片段的多态性(图 5-1)。

方案 2　RAPD 操作要点

设备与试剂：

1. 真菌基因组 DNA(50ng/μl)。

2. PCR 仪　PCR 管或硅化的 0.5ml eppendorf 管，电泳装置。

3. 随机引物(10mer，5μmol/L)　购买成品。

4. Taq 酶　购买成品。

5. 10×PCR 缓冲液　配方见第八章。

6. $MgCl_2$　25mmol/L。

7. dNTP　每种 2.5mmol/L。

方法与步骤：

1. 在 25μl 反应体系中，加入 10×PCR 缓冲液 2.5μl，模板 DNA 1μl(50ng)，随机引物 1μl(约 5pmol)，$MgCl_2$ 2μl(1.5～3.0mmol/L)，dNTP 2μl(200～400μmol/L)，Taq 酶 1U，加 ddH_2O 至 25μl，混匀稍离心，加一滴矿物油。

2. 用以下程序进行 PCR　预变性 94℃ 2min，然后循环：94℃ 1min，36℃ 1min，72℃ 1min，共 40 轮循环。

3. 循环结束后，72℃ 10min，4℃保存。

4. 取 PCR 产物 8μl 于 2%琼脂糖胶上电泳，稳压 50～100V(电压低带型整齐，分辨率高)。

5. 电泳结束，观察、拍照(图 5-1)。

注意：①电泳时一般 RAPD 带有 5～15 条，大小 0.1～5.0kb。②特异性的 DNA 带可以克隆作为一个新的分子标记应用。

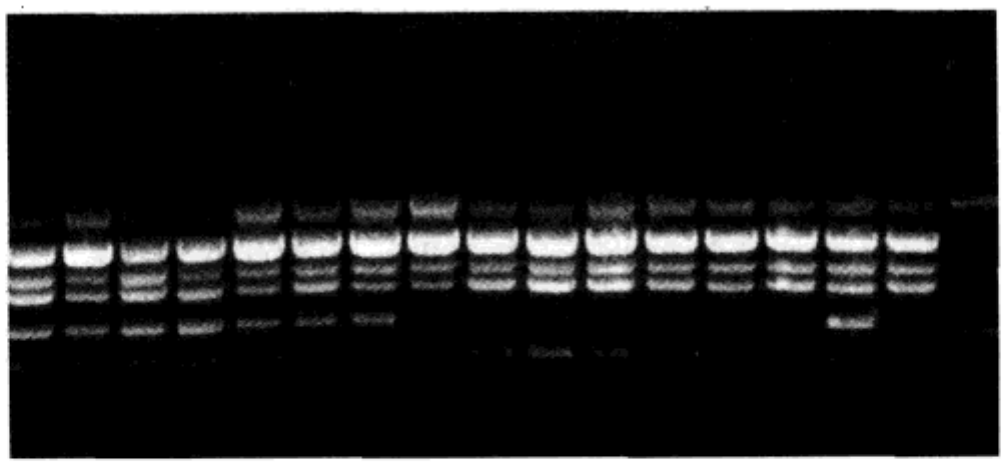


图 5-1　RAPD 电泳图谱

2.1.3　AFLP

AFLP 的全称是扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism)，此技术是建立在基因组限制性片段基础上的 PCR 扩增。由于不同真菌的基因组 DNA 大小不同，基组 DNA 经限制性内切酶酶切后，产生分子量大小不同的限制性片段。使用特定的双连接头与酶切 DNA 片段连接作为扩增反应的模板，用含有选择性碱基的引物对模板 DNA 进行扩增，选择性碱基的种类、数目和顺序决定了扩增片段的特异性，只有那些限制性位点侧翼的核苷酸与引物的选择性碱基相匹配的限制性片段才可被扩增。扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，染色后根据凝胶上 DNA 片段的有无检出多态性，从多态性片段中找出合适的片段作为分子标记，用于遗传图谱的制作。

2.1.4　微卫星 SSR(simple sequence repeats)

微卫星 DNA 是一种广泛分布于真核生物基因组中的串联简单重复序列，每个重复单元的长度在 1～10bp 之间，常见的微卫星如 TGTG……TG＝(TG)n 或 AATAAT……AAT＝(AAT)n 等，不同数目的核心序列呈串联重复排列，而呈现出长度多态性。在基因组中，因每个 SSR 序列的基本单元重复次数在不同基因型间差异很大，从而形成其座位的多态性。而且每个 SSR 座位两侧一般是相对保守的单拷贝序列，据此可设计引物，其关键

是首先要了解 SSR 座位的侧翼序列(flanking region),寻找其中的特异保守区。

3　电泳核型分析

由于真菌染色体较小,采用常规的细胞学方法鉴定其染色体数目及基因组大小难度较大。真菌电泳核型分析的实质就是利用脉冲电场凝胶电泳技术将真菌的核染色体分开,从而获得染色体数目、大小及基因组大小。这一技术还可应用到以下几个方面:估测整个基因组的大小,特定基因物理图谱构建和染色体多样性分析。

3.1　完整的染色体 DNA 的准备

完整的染色体 DNA 是非常脆弱的分子,需要尽量避免在操作中将 DNA 降解成小片段。制备完整的染色体 DNA 常用琼脂糖包埋的方法,是将整个染色体包埋在固体的琼脂糖中,这样避免了制备过程中机械张力、内源 DNA 酶等物理化学方法对 DNA 的破坏。然而,在丝状真菌中,将细胞包埋在琼脂糖中,首先要去除丝状真菌的细胞壁。去除细胞壁,可以采用制备原生质体的方法解决见第二章。

方案 3　琼脂糖栓中制备完整染色体 DNA

试剂:

EX 缓冲液:0.5mol/L EDTA,0.01% Triton X-100。

方法与步骤:

1. 制备原生质体(选择适合于所研究真菌的方法见第二章)。注意,等渗溶液中不能有 Mg^{2+} 存在。从细胞裂解液中过滤收集到的原生质体,用等渗溶液洗涤,去除原生质体酶解液;用 20%(W/V)蔗糖或者山梨醇溶液悬浮原生质体(等渗溶液的浓度根据不同的真菌而有所不同),确定浓度 2×10^9/ml。

2. 吸取 4ml 原生质体悬浮液,预热到 37℃。加入等体积的保温在 45℃的 1.2%InCert 琼脂糖(FMC)(20%蔗糖配制)。用枪头轻轻吹打,混匀,然后将原生质体悬浮液倒入 25ml 的锥形瓶中,瓶中装有等体积预热到 50℃的矿物油。涡旋约 30s,锥形瓶水平放置,使瓶内液体撞击瓶壁。迅速将锥形瓶放入冰水中,使琼脂糖迅速凝固。

3. 加入等体积的 EX 缓冲液,转移到 15ml 离心管中,4 000g 离心 5min。弃上清液,注意不要倒掉琼脂糖栓。加入 4ml EX 缓冲液,用去除尖端部分的枪头吹打,使琼脂糖栓悬浮,4 000g 离心 5min,重复 2 次。最后,倒掉 EX 缓冲液,4℃,密封管中保存琼脂糖栓。

注意:高质量的完整染色体 DNA 的制备,取决于原生质体的浓度,因此初次制备完整染色体 DNA 时,需要经过预试验来确定原生质体的浓度。

方案 4　琼脂糖栓电泳

试剂:

TEX 缓冲液:含有 0.01% Triton X-100 的 TE 缓冲液。

方法与步骤:

1. 用 10 倍体积的 TEX 缓冲液平衡 100μl 的琼脂糖栓。瞬时离心,小心弃去上清液。

将琼脂糖栓加入模具中，用吸水纸去除多余的 TEX 缓冲液。注意，不能吸干，防止 DNA 从琼脂糖栓中扩散出来。

2. 用熔化的 0.5×TBE 配制的 0.6%InCert 琼脂糖粘合琼脂糖栓，4℃使之冷却变硬。制胶板上放好模具，倒入冷却到 50℃左右的 0.8% SeaKem GOLD 琼脂糖，形成凝胶。4℃放置 20min 使之变硬。

3. 轻轻移去模具，用 0.5×TBE 配制的 0.8%的琼脂糖凝胶灌注。电泳缓冲液没过胶板，电泳(14℃)。

3.2 钳位均匀电场电泳(CHEF 电泳)

钳位均匀电场电泳(contour-clamped homogeneous electric field，CHEF)凝胶电泳中，电场是由多个电极产生的。这些电极围绕水平凝胶呈四边形或六边形，其电位被钳制在预先设定的水平。通过周期性改变凝胶上电场的角度可以分离长达几百万碱基对的 DNA 分子。

方案 5 钳位均匀电场电泳

试验设备与试剂：

1. CHEF 电泳系统(Bio-Rad 公司)，包括一个 Bio-Rad 12.7cm×14.0cm(5 英寸×5.5 英寸)的制胶模具和形成加样栓的模具，一般要在一个冷房间中装配。

2. 接通电泳槽的冷却水。

3. TBE：45mmol/L Tris 碱，45 mmol/L 硼酸，1.25mmol/L EDTA pH8.3。

4. Bio-Rad 染色体梯度琼脂糖(用于 3～4Mb 大小的染色体)或者 Beckman LE 琼脂糖(用于 1～2Mb 大小的染色体)。

方法与步骤：

1. 用 GTBE 或者 0.5×TBE 缓冲液制备 CHEF 凝胶装置用的 1%琼脂糖凝胶。

2. 让胶凝固，然后小心拔出梳子，将在琼脂糖栓中制备的样品插入样品孔中。

3. 将胶块放入凝胶槽，在其上覆盖 2～3nm 高的缓冲液，调节循环装置至＞100ml/min，并且监测缓冲液温度。待缓冲液达到所需要的电泳温度后等 15min，以确保凝胶在正确温度达到平衡。

4. 液相样品加样。

5. 特别注意极性，将可编程的转换装置与稳压直流电源，分压环路及凝胶装置相连，把转换装置置于合适的转换程序，开始电泳。

6. 电泳结束后用溴化乙锭染色。与标准的琼脂糖凝胶一样拍照。

CHEF 凝胶电泳所获得 DNA 片段的最大分辨率的长度范围取决于脉冲时间。通常较短的时间用来分离较小的 DNA 片段，而较长的时间分离较大的 DNA 片段(表 5-1)。

表 5-1 电泳条件

%琼脂糖	长度范围/kb	切换时间	V/cm	时间/h
1%快速泳道	6～500	梯度，3～80s	6	18
	10～800	梯度，6～80s	6	20
	100～1 000	60s	6	15

续表

%琼脂糖	长度范围/kb	切换时间	V/cm	时间/h
		然后 90s	6	9
0.8%快速泳道	150～2 000	梯度,30～180s	5	24

注:所有的凝胶是在 0.5×TBE 中电泳。若要在 800～2000kb 的范围内获得更高的分辨率需要泳比表上更低的电压和更长的电泳时间。

4　物理图谱

物理图谱(physical map)是利用限制性内切酶将染色体切成片段,再根据重叠序列确定片段间连接顺序,在 DNA 分子水平上描述染色体中界标间顺序和距离的图谱。构建物理图谱的目的是要明确单个基因或某些感兴趣的基因片段与染色体上已知的分子标记之间的物理距离,或者说 DNA 序列的长短。

物理图谱的终极图谱是 DNA 序列图谱。物理图谱的构建,为基因组结构、组织与进化上的研究提供了分子基础,也为基因的定位、克隆与分析基因之间的相互关系提供了更为简洁和有效的途径。

4.1　丝状真菌物理图谱的步骤

各种丝状真菌中,RecA-AC 技术(RecA-assisted achilles' cleavage)是行之有效的构建物理图谱的方法。

在有 ATP 存在的条件下,大肠杆菌的 RecA 蛋白能够催化单链 DNA 分子与已经互补的 DNA 分子之间发生交换。如果用 ATP 的同系物代替 ATP,RecA 蛋白可以将寡核苷酸序列连接到与它同源的互补双链上,形成稳定的三链复合体结构。而甲基化酶不能作用于三链复合体。当用甲基化酶处理后,再用限制性内切酶消化 DNA 时,则没有甲基化的区域被酶切。通过电泳可以检测两个形成三链复合体结构区域之间的距离。

方案 6　染色体 DNA 的 RecA-AC

试剂:

1. 1M DTT　新鲜的 DTT 是 RecA-AC 成功的关键,配制好的 DTT 分装成小管冰冻,不能重复冻融。

2. $RecA_4$ 缓冲液　25mmol/L Tris-醋酸 pH 7.5,4mmol/L 醋酸镁,10mmol/L DTT。

3. 10×$RecA_{10}$ 缓冲液　250mmol/L Tris-醋酸 pH 7.5,100mmol/L 醋酸镁,100mmol/L DTT。

4. 1mg/ml BSA TE 缓冲液配制。

5. 0.4mmol/L ATPγS　10μl 每管,−80℃保存,不能重复冻融。

6. 120mmol/L 醋酸镁储存液。

7. 1.6mmol/L S-腺苷甲硫氨酸　用 5mmol/L 硫酸稀释储存液。

8. ES　0.1mol/L EDTA,1% SDS。

方法与步骤：

1. 琼脂糖栓的制备参见方案 4，随后用 TEX 缓冲液平衡 100μl 琼脂糖栓，再用 $RecA_4$ 缓冲液平衡 3 次。去除液体，加入 10μl BSA，置于冰上。

2. 混合 1μl 核蛋白酶(0.165μg/μl)和 6.25μgRecA 蛋白，形成 Oligo-RecA 核蛋白。加入 1μl 10×$RecA_{10}$缓冲液和水至 9μl。37℃温浴 1min。然后加入 1μl 0.4mmol/L ATPγS，37℃ 10min。

3. 37℃温浴，然后加入 10μl 核蛋白溶液。调节醋酸镁的浓度到 4mmol/L，置于冰上，过夜。

4. 次日早晨，将溶液置于 37℃温浴 30min。然后加入 DTT 至 10mmol/L，醋酸镁储存液调节 Mg^{2+} 浓度到 12.5mmol/L。最后，加入 1μl(40U) *Eco*RI 甲基化酶，加入 5μl 1.6mmol/L S-腺苷甲硫氨酸，37℃ 1h。

5. 加入 1 倍体积 ES，52℃ 30min，失活甲基化酶，分离核蛋白混合物。

6. 用 TEX 缓冲液平衡微珠，然后用 *Eco*RI 限制性内切酶缓冲液平衡。加入 10μl BSA，1μl *Eco*RI，37℃ 1h。

7. 加入 1 倍体积的 ES，52℃温浴 15min，使酶失活。TEX 缓冲液平衡微珠，进行 CHEF 电泳。电泳结束和按照方法 1 中的操作染色。

实验室初次做 RecA-AC，建议选择第二种酶切割染色体 DNA，比如 *Not*I。Southern 杂交分析说明 *Not*I 可以有效地切割 RecA-AC。

4.2 基因组 DNA 文库的构建和筛选

一般来说，一个基因组文库应包含的克隆数与生物基因组的大小和被克隆 DNA 片段的长度有关。根据 Charke-Carbon 公式可以计算某一基因文库中应该包含的克隆(任何特定 DNA 序列)数，也就是满足最低要求的基因文库的库容量。

$$N = \ln(1-P)/\ln(1-a/b)$$

P——文库中包含供体细胞中任何 DNA 序列信息的概率(probability)，即希望获得的概率(通常设为 99%)，代表了基因文库的完备性。

N——重组子数(基因文库大小、库容量)，表示文库中以 *P* 概率出现在细胞中某段 DNA 序列理论上应具有的最少重组子克隆数。

a——文库中每个重组子所含外源 DNA 片段的平均长度。

b——生物基因组的大小，即单倍体基因组 DNA 的长度。

构建基因组文库的基本步骤如下：

(1) 载体 DNA 的制备。

(2) 高相对分子质量染色体 DNA 及基因片段的制备，或者某一特定类型细胞表达的 mRNA 经反转录酶催化形成与之互补的 cDNA。

(3) 载体与 DNA 基因片段的体外连接。

(4) 包装蛋白的制备、重组体的体外包装。

(5) 将重组 DNA 分子导入宿主，重组克隆的筛选、鉴定。

(6) 文库的扩增、保存。

目前常用于基因组文库构建的载体有很多，比如 λ、P1、cosmids、forsmids、BACs 和

YACs。

λ噬菌体载体或杂合质粒载体即黏粒(含有指导 DNA 进入噬菌体颗粒的特定的 λ 噬菌体序列)克隆效率高,同时插入片段相对较大,常常被用作构建基因组 DNA 文库的载体。

对于 λ 噬菌体载体和黏粒载体的选择,一般是依据目的基因组 DNA 片段的大小而定的。许多研究者认为噬菌体文库易于操作,当目的 DNA 片段不超过 20kb,选择 λ 噬菌体载体。对于较大一些的片段则建议使用黏粒载体,因为它的插入容量可达 40kb。

有许多容易操作的 λ 噬菌体载体,他们均有 2 个基本的特征:具有接受几种限制性内切酶消化产生的片段的能力;外源 DNA 插入位点带有可便于筛除原始载体的所谓"填充序列"的生化和(或)遗传学选择标记。

λEMBL3 是一个非常有用的载体,可以通过遗传和生化选择的策略避免由于纯化操作而去除填充序列,同时,它的多克隆接头有几种常见的酶切位点。

任何一种含 λ 噬菌体 cos 位点的质粒型克隆载体都可以称做黏粒。针对特殊应用而设计的许多黏粒载体还会包含他的结构元件,降低了载体的克隆容量。但是除非有特别的需要,在载体选择时应尽量避免使用这种载体。pjb8 是一种既简单又实用的黏粒载体,长 5.4kb,可插入由 sau3a 消化的基因组 DNA 片段,并且可以利用几种黏粒克隆策略。

为了达到真菌基因组分析目的,构建的基因组文库代表性好、质量高的最有效的载体系统是 λ 载体,可以插入 23kb 的片段,文库可以长期保存。同时,黏粒、forsmids 载体可以插入高达 45kb 的片段;BAC 可以插入高达 300kb 的片段。以下介绍 BAC(bacterial artificial chromosome)文库的构建。

最初,BAC 载体是由 Shizuya 等人于 1992 年通过利用细菌染色体的复制等重要元件建立的克隆载体,通常是指克隆到细菌中的来自其他物种的长度为(1～2)×10^5个碱基对的大片段 DNA。外来的 DNA 一旦被克隆到宿主细菌中,就会产生大量拷贝。BACs 是构建丝状真菌基因组文库最有效的载体。丝状真菌中包括许多重复序列 DNA,带有外源片段的 BAC 载体在细菌细胞中通常仅单个拷贝,这一特点有利于保持 DNA 大分子,尤其是重复序列多的大分子,在细胞内稳定复制而不发生重组;而且 BAC 载体本身分子质量小,可以插入高达 300kb 的片段,已经满足大多数丝状真菌基因组的研究。例如,代表性的丝状真菌基因组 40Mb,假如克隆片段 100kb,覆盖率 99%需要 1 840 个克隆。尽管 YACs(yeast artificial chromosomes)能容载较大的片段,但是 YAC 克隆的稳定性较差,操作也不方便。

4.3　BAC 文库的构建

细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome,BAC)是以大肠埃希菌致育因子(fertility,F)为基础的合成载体。F 因子的下述特性使其作为基因组 DNA 的高容量载体具有独特的优点:

(1) 低拷贝数(1～2 个分子/细胞),含 parA 和 parB 确保细胞在分裂时,F 因子 DNA 分子能精确地分配到子代细胞。ParB 负责排斥细胞中的外源性 F 质粒。BAC 的低拷贝数加上细胞的隔绝环境,限制了细胞内质粒分子间的重组。实际上,这意味着重组 BAC 中外源 DNA 的重排水平和嵌合程度低于 YAC。

(2) 能扩增非常大的 DNA 片段。自然发生的 F 因子能携带 1/4 的大肠埃希菌染色体而不显张力或不稳定。

(3) 易于操作。由于 F 因子呈闭环结构,所以可用一些熟悉的技术将它直接从大肠埃希菌中分离出来。常用的技术有:碱裂解、CsCl-溴化乙锭密度梯度离心、树脂旋转柱层析。通常,5ml 菌液中获得的 BAC DNA 足以用于限制酶酶切分析、PCR 和荧光原位杂交。

4.3.1 准备 BAC 载体 DNA

BAC 载体 pBeloBAC11 载体中含有 lacZ 基因,这样重组子可以通过蓝白斑进行筛选。由于载体 BAC 拷贝数比较低,因此需要大量的培养基培养大肠埃希菌,在此过程中,需要防止其他细菌 DNA 的污染。

方案 7 准备 BAC 载体 DNA

设备与试剂:

1. Qiagene-tip 500 DNA 纯化柱。
2. 溶液Ⅰ 25mmol/L-HCl pH 8.0,50mmol/L 葡萄糖。
3. 溶液Ⅱ 0.2mol/L NaOH,1% SDS。
4. 溶液Ⅲ 5mol/L 醋酸钾(KAC) pH4.8。

方法与步骤:

1. 挑取单菌落,用 3L 含 12.5μg/ml 氯霉素的 LB 培养基培养,37℃剧烈振荡 20h。
2. 收集细胞,小心去掉培养基残液。用 75ml 溶液Ⅰ悬浮所有的沉淀,然后将沉淀分装到 3 个 250ml 的瓶中,每瓶中加入 60mg 溶菌酶,颠倒混匀。
3. 每瓶中加入 50ml 溶液Ⅱ,颠倒混匀,置于冰上 10min。
4. 每瓶中加入 40ml 溶液Ⅲ,颠倒混匀,置于冰上 10min。
5. 4℃,8 000g 离心 30min,除去细胞碎片沉淀。吸取上清液,加入 RNA 酶,终浓度 0.1mg/ml。
6. 用 Qiagene-tip 500 柱子纯化 BAC DNA。
7. 用 18.6ml 的 TE 溶液溶解 Qiagene 制备管中的 DNA,加入 20.5g CsCl 到溶液中。再加入 0.4ml EB(10mg/ml),用 Beckman 离心机的 70.1 Ti 型号的转子(或与其相当的转子)进行 45 000r/min 超速离心 3～4 天。
8. 从 CsCl 密度梯度中分离低分子质量的 DNA,用水饱和 *n*-丁醇洗脱 EB;再将 DNA 悬浮到 TE 中过夜。
9. 加入 0.1 倍体积的醋酸钠 pH5.2 和 2 倍体积的无水乙醇到 BAC DNA 溶液中,沉淀,离心。用 70%的乙醇溶液洗涤沉淀,吹干,最后溶解在 20μlTE 中。测定 DNA 的浓度,用 TE 溶液调节到 0.5μg/ml。

4.3.2 准备 BAC 插入 DNA

真核生物染色体 DNA 的提取,首先要破碎细胞,制备完整的真菌染色体 DNA 对于文库的构建非常重要。BAC 文库要求插入的 DNA 片段在 100～300kb 之间。

方案 8 准备 BAC 插入 DNA

实验设备与试剂:

同方案 7。

方法与步骤：

1. 接方案 6，10 倍体积 TEX 溶液平衡 500μl 琼脂糖栓，然后用 1×酶切缓冲液平衡。

2. 去掉多余的酶切缓冲液，加入 0.1 体积的 1mg/ml 的 BSA，分装 1 管 100μl，8 个 50μl。

3. 加入 1U 的酶到 1 号管，轻轻混匀。取 50μl 微珠到 2 号管，混匀。如此梯度稀释 9 管，适合温度下酶切 1h。

4. 加入 10 倍体积的 ES 终止反应，52℃加入 5min。用 10 倍体积的 TEX 平衡微珠，离心，去上清液。

5. 加样电泳(方法)。CHEF 电泳，分析 DNA 片段的大小。

6. 根据电泳结果确定适合的酶切反应浓度。

7. 大量酶切，准备部分酶切的 DNA 片段。

4.3.3　BAC 插入 DNA 大小的选择，恢复和克隆

方案 9　BAC 插入 DNA 大小的选择，恢复和克隆

实验设备与试剂：

同方案 7。

方法与步骤：

1. 利用 CHEF 电泳，选择条件 2，分离部分酶切的 DNA 样品，使用 0.5×TAE 配制的 1%Seaplaque 琼脂糖。λ DNA 作为标记。

2. 切取合适大小的 DNA 片段。注意：不能将 DNA 长时间暴露在紫外灯下。选择 200～300kb 之间的片段，切胶回收。

3. 将切取的凝胶碎片加入到 0.5×TBE 配制的 0.8%SeaKem Gold 琼脂糖胶的泳道里，电泳 15min，使用条件 1，去掉小片段的污染。

4. 将凝胶碎片转移到离心管中，65℃水浴 5min，使胶融化。每 200μl 融胶中加入 0.1 倍体积的 10×β-琼脂糖酶缓冲液和 1U 的 β-琼脂糖酶。42℃温浴 1h。

5. 连接反应总体积小于 100μl，用 100～500ng 去磷酸化处理的 BAC 载体和不大于 50μl 的合适大小的 DNA 片段进行连接。

6. 吸取 1～2μl 的连接反应液，用电击转化的方法转化大肠埃希菌。大肠埃希菌的菌株推荐用 DH10B(Gibco BRL)和 XL10-Gold-kan^{R}细胞(Stratagene)。电击转化后，将细胞涂到含有 12.5U/ml 氯霉素，50U/ml X-gal，0.2mmol/L ITPG 的 LB 平板上。白色重组的 BAC 克隆在平板上生长。

7. 挑取克隆进行保存和筛选之前，需要用标准的碱裂解法检测 BAC 插入片段的分布。

4.4　挑选克隆和文库的重复性

这类阵列文库从学术机构不容易获得，主要由商业公司(如 Research Genetic)保存。

4.5　在杂交膜上排列文库克隆

多数情况下，文库克隆的鉴定是在杂交阵列中进行。商业提供的 96 孔和 384 孔复制工

具可以有效地、迅速地制作阵列克隆。

方案 10　将文库克隆排列到杂交膜上

设备与试剂：

96 孔和 384 孔复制工具，Whatman 3MM 纸，11.5cm×7.5cm 杂交膜。

变性液：0.5mol/L NaOH；中和液：0.5mol/L Tris-HCl pH7.5，1.5mol/L NaCl；20×SSC：17.5g NaCl 和 88.2g 二水合柠檬酸钠(1L 水中)。

方法与步骤：

1. 准备含有抗生素的 LB 平板，小心不能产生气泡。

2. 尼龙膜高压灭菌。对膜进行编号，平铺到平板上，注意膜与培养基之间不能产生气泡。

3. 使用灭过菌的 96 孔和 384 孔复制工具，转移培养液到杂交膜上。建议每个进行 2 个重复。

4. 用 10%漂白剂浸泡复制针上，去除污渍；然后用水冲洗，95%乙醇溶液灼烧；最后，在放入平板之前先在无菌水中冷却。

5. 将平板倒置，于 37℃放置过夜，约 20h。

6. 用镊子将膜从平板的表面揭下，放在吸水纸上，含有菌落的一面向上，在空气中晾干。

7. 将膜放在 Whatman 3MM 纸上浸泡在变性液中 10min。然后将膜转移到 Whatman 3MM 纸上，在中和液中浸泡 10min。

8. 从第二张纸上取下膜，在 2×SSC 中轻轻振荡 10min。将膜转移到 2×SSC，0.5% SDS 中，用一张干净的纸轻轻摩擦膜的表面，去掉细胞碎片。膜上将会留取菌落的印记。

9. 在紫外线下交联 DNA，然后在空气中晾干。

10. 杂交方法见方案 12。在杂交过程中避免使用含有鱼精 DNA 和 Denhardt's 溶液的封闭液，以免使杂交的背景不清晰。

4.6　收集克隆文库

构建在 BAC 载体中的基因组文库通常被分布到有序的阵列中，以便用杂交法筛选或被合并成大小不同的库、小库、亚库，用 PCR 法进行快速筛选。新分离的 BAC 克隆的真实性及其在染色体上的定位分析，研究方法包括：多对引物的 PCR 分析、DNA 测序、多种探针的 Southern 杂交及分析放射性杂交所获得的遗传图谱、荧光原位杂交的物理图谱。

方案 11　收集克隆文库

设备：

1. Omnitrays(NNI)或者灭菌的枪头盒。

2. 96 孔和 384 孔复制工具。

方法与步骤：

1. 在无菌的 Omnitrays(NNI)或者灭菌的枪头盒中倒入含有抗生素的 LB 固体培养基。用一个无菌的 96 孔和 384 孔复制工具将菌落复制到平板表面。96 孔和 384 孔复制工具重复利用时需要消毒，重新灭菌。

2. 倒置平板或者盒子，于 37℃放置过夜，约 20h。

3. 当菌落生长到 2～4mm，吸取 5ml LB 培养基到平板表面，用一个无菌的刮板轻轻在培养基表面摩擦。吸取细胞悬浮液到离心管中，然后再加入 5ml LB 到平板中重复收集剩余的细胞。离心弃上清液。

4. 沉淀的菌落，用标准的碱裂解法提取 DNA，或者将沉淀冰冻，以后再进行 DNA 的提取。

4.7　文库的保存

－80℃长时间保存文库。在需要使用文库或者复制文库的时候再去解冻文库。克隆恢复的时候不能解冻。

5　筛选文库

基因组文库包含很多克隆。从中找出包含目的基因的克隆的过程，就是文库的筛选。筛选文库的基本原则是利用一段已知序列的目的基因的片段为探针，通过杂交的方式找到目的克隆，或者通过 PCR 的方式，从众多的文库质粒中找到目的克隆。

5.1　杂交法筛选文库

在许多真菌基因组的研究中，例如染色体步移，基因组重建试验，基因组稳定和进化的分析，基因组文库分析，都是利用 RNA 或者 DNA 探针杂交进行的。筛选整个文库最快速的方法就是通过杂交建立文库阵列。

方案 12　Southern 杂交分析混合文库和克隆阵列文库

试剂：

1. 杂交缓冲液　50%甲酰胺，0.125mol/L $NaHPO_4$ pH7.2，7%SDS，10mmol/L EDTA。

2. 0.5 mol/L $NaHPO_4$ 储存液　配制 0.5mol/L $NaHPO_4$ 的溶液，用磷酸调节 pH。

3. 变性的 RNA 或者 DNA 探针。

4. SSPE　800ml 水中加入 175.3g NaCl，27.6g NaH_2PO_4，7.4gEDTA，用 NaOH 调节 pH7.4，然后加水到 1L。

方法与步骤：

1. 将膜放在足量的杂交缓冲液中 42℃预杂交 15min。倒掉预杂交液，重新加入 5ml 新鲜的缓冲液。缓冲液加入之前预热到 42℃。

2. 将变性的探针加入到杂交缓冲液中，注意不能直接加到膜上。旋转混合探针，使溶液覆盖膜。42℃，杂交，不少于 16h。

3. 在 2×SSPE 中洗涤膜，42℃，10min，洗涤 2 次；在 65℃，15min 洗涤 1 次。最后在 0.1×SSPE 0.1%SDS 中，15min 洗涤 1 次。

4. 曝光/显色

(1) 将膜放在纸巾上，用保鲜膜封闭，曝光。

(2) 或者，用非放射性的检测方法显色。

扫描结果：

(1) 确定哪些群体包括阳性克隆。

(2) 比较哪些群体包括需要的克隆。

5. 在 0.1×SSPE,0.1%SDS 中 100℃加热 1h,迅速剥离杂交膜。在新鲜的 0.1×SSPE 0.1% SDS 溶液中洗膜。然后晾干,保存在 2 层滤纸之间。

5.2 从冻存的存储文库中恢复克隆

恢复克隆时,不要使冻存的文库全部融化,应该用无菌的牙签刮取少量的冰晶,转移到含有抗生素的固体恢复平板上,然后用无菌的接种环划取单菌落。

6 染色体步移(chromosome walking)

从基因组中克隆基因时,已知该基因在染色体上的位置但没有该基因的序列信息,无法制备相应的探针,因此无法直接筛查文库克隆基因。此时,如果知道离开该基因一定距离上的 DNA 序列,则可用这个 DNA 序列作探针,通过染色体步移来逐步接近并最后达到待克隆的基因。其基本原理是用探针筛查文库,得到阳性克隆后,将这个重组载体中的插入片段分离出来,然后用这个片段的末端部分(注意不能包含重复序列)作为新一轮筛查文库的探针;得到新的重组载体中的插入片段,同上一个插入片段的末端部分(即探针序列)是相同的。也就是这两个片段是在同一条染色体上相互邻接的。于是,再用新的插入片段的末端部分作为探针,再去筛查文库。通过一系列的操作,得到的插入片段逐渐连接延伸,最后可以步移到待克隆的基因。

染色体步移是用与同一染色体上靶基因相近的克隆的 DNA 片段或者分子标记来分离基因或者其他染色体结构的方法。克隆的 DNA 片段是用来识别 DNA 文库中重叠序列,重复这个过程,用新识别的克隆片段末端来筛选获得下一个未知克隆。最终,染色体的成功步移将分离出包含所需序列的克隆。

6.1 根据插入片段末端的序列合成探针

当用源于插入片段最末片段的探针来识别重叠序列时,染色体步移进行得最快。设计大量的能特异地利于产生这些探针的 BAC/黏粒载体。这些载体结合有噬菌体的 RNA 合成酶启动子,位于克隆位点(29～31)的两侧,允许插入在末端标记序列的 RNA 转录本的产生。这些标记的 RNAs 可以作为探针筛选文库,识别重复克隆。

方案 13 BAC 或者黏粒末端 RNA 探针的合成

以下所有操作务必在无 RNA 酶的条件下进行。

实验试剂:

1. BAC/黏粒克隆。
2. 100mmol/L rCTP。
3. RNasin(Promega)。
4. [α^{32}P]rCTP(3 000Ci/mmol)。

5. 5mmol/L rATP,rGTP,rTTP。

6. 聚合酶(T7、T3 或 SP6)。

实验步骤:

1. BAC/黏粒克隆构建线性 DNA 模板。

2. 室温下,加入以下试剂:

2μl 10×聚合酶缓冲液

0. 5μl RNasin;

2μl 0. 1mol/L DTT;

2μl 5mmol/L rATP,rGTP,rTTP;

2. 5μl 100μmol/L rCTP;

2μl[α^{32}P] rCTP(3000Ci/mmol);

1μg 线性 DNA;

加水至 19μl。

3. 加 1μl 聚合酶(T7、T3 或 SP6),37℃离心 1h。

4. 加 1μl PQ1 DNA 酶(Promega),37℃离心 15min。

5. 乙醇沉淀,以去掉未重组的核苷酸,或从 p-30 凝胶中用层析柱纯化。

6. 煮沸 5min,使探针变性,以用来杂交。杂交条件见方案 12。

大多数载体用来克隆大量插入片段并且包含克隆位点周围限制性酶切位点。这使得插入的 DNA 片段从载体上被切下,这样,就便于接下来的分析。构建含有克隆末端的衍生物,可能也会有效地产生插入序列末端的探针。

方案 14　根据插入片段末端序列制备的探针

实验试剂:

1. 黏粒 /BAC DNA。

2. T4 DNA 连接酶(NBL)。

3. 连接酶缓冲液。

实验步骤:

1. 在 10μl 反应体系中,用载体上没有酶切位点的酶消化 100ng 黏粒 /BAC DNA。

2. 对于耐热酶类(http://www. neb. com/neb/tech/tech_resourse/restriction/properties /heat_inactivation. html)用 PCI 提取方法除去酶,并用乙醇沉淀 DNA,然后用 20μl TE 回溶。对于对热敏感的酶类:转移消化液至 65℃,10min,以使这些酶失活。

3. 加水使 DNA 溶液至 45μl,然后加 5μl 10×连接酶缓冲液和 40 NBL U 的 T4 DNA 连接酶,16℃,离心,过夜。

4. 把全部连接产物转入大肠埃希菌中(或者 1～2μl 进行电穿孔)　当准备末端克隆衍生物进行分析时,DNA 应至少在 3 个克隆中存在。用于降解/再连接的酶再用来消解克隆,用少切点的内切酶从克隆位点两端切开,释放出载体,同时还带有来自 2 个插入 DNA 末端的多余片段。应该说明的是,当有 3 个片段以上时,有的克隆片段可能会在插入序列末端附近有少见的酶切位点。插入序列末端任何情况下,这 3 个克隆都应该是相似的。它很容易就会检测到。一般来说,至少 2 个克隆会有同样的限制类型,而这些限制类型正是衍生物。

把原先的序列作为探针，通过 Southern 杂交正好可以识别末端克隆衍生物的末端片段。所需序列不会与之杂交，这样它就被从凝胶中洗脱下来，并采用标准方法标记。

6.2 正确步移方向的确定

分离出了含有与靶基因相连的分子标记(marker)或者黏粒质粒时，染色体步移就开始了。从这个意义上说，知道染色体步移的方向是很有好处的。如果有大规模的靶基因后代群落图谱，就能用几个已分好的交叉点从原来的分子标记中分离出靶基因。这样，BAC/黏粒的插入序列就可能跨越一个或多个交叉点。据此，我们就可以确定 BAC/黏粒的步移方向，并指明最接近靶基因的插入序列末端。

如果无法测到插入序列末端之间的交叉点，在新克隆找到一个交叉点并检测到 RFLPs 之前，你最好进行双向步移。这个过程依赖于杂交后代群体的大小以及 DNA 片段交换在染色体上发生的平均距离，根据具体情况可能会引起染色体多移几步。

如果位于靶基因侧面的两端都有分子标记，RecA-Ac 可以用物理方法来证实黏粒方向。在含侧面分子标记的 BACs/黏粒限制位点上，同时发生的基因组分裂可以释放含有靶基因的片段。只有一个 BAC/黏粒插入序列末端位于这个片段上。正是这个末端被用于步移。这些能通过从插入序列两端，用探针探查 CHEF-分离后 RecA-AC 产物的 Southern 印迹杂交来识别。

6.3 过程的控制

对步移过程的连续监控是绝对必要的。这可以提供进展信息，表明何时步移到达靶点。但最重要的是，它能确保步移始终在轨道上。真菌基因组常充满着中等长度的重复或复制序列，如果没有检测这样的序列，就将导致染色体步移跳到另一条染色体上。

每一步中都被识别的 BAC/黏粒检测到的图谱化的新 PFLPs 监控整个过程。为了这个目的，没必要在图谱化群落中包括每一个后代分离物。但是，其中包括大量所有的重组后代以表明交叉点何时被跨过是很重要的。大量非重组后代也应该检测出来。否则，当新黏粒来自未连接点时，一步移动就可能穿过大量交叉点。

6.4 步移障碍的克服

染色体步移中最可能遇到的障碍是在重复 DNA 区域。一般而言，许多重复 DNA 区域并非太大问题，除非它们发生在插入序列末端，因为在这里，重复 DNA 区域将导致针对基因文库中许多基因克隆的末端特异性探针的杂交。如果这段重复区是一个独立片段，我们经常可以使用来自插入序列内部的探针去找到一个 BAC/黏粒克隆，这种方法将跳过冲突序列。然而，重复区域基因簇很少被证明有探针性质。即使在这种情况下，人们也经常可以识别出分散于重复区段之中的单拷贝基因片段。这些片段能使重复基因的克隆得到识别。

这些途径可能需要复制型克隆的广泛特征去识别染色体移动的合适探针。很明显，高度重复 DNA 区域的长印迹滑行将会把移动变成缓慢步移。然而，对基因文库中一些不存在的或者无法克隆的基因区而言，一些障碍可能潜在地完全阻止移动。当然，通过 RecA-AC 测试染色体的目标区域，这些障碍是能够避开的。断裂产物片段能够被亚克隆从而产

生新的探针，这些探针可以在出现问题区域之前进入步移。

另一个比较少见的问题因为复制型的染色体片段而显现出来。在这种情况下，很有必要穿过 2 个复制型拷贝到其中一个出现在每个复制型的另一端。那时，步移能够在正确的位点被发现，通过 PFLPs 来识别。

6.5　含有靶基因的克隆的识别

与用有效的方法使染色体步移到一个基因上同样重要的是，知道何时停止。如果通过步移新克隆已被详尽绘出，应该意识到它何时到达靶点。因为被新克隆识别的 PFLPs 会和这个基因同时分离。但是，只要步移到了靶点，它就会四散开来阻止移动。相反，步移会一直继续，直到交换点在靶点的另一端被跨过。最终，有证据表明，当 BAC/黏粒克隆在转化试验中能表现为期望的表型时，则证明基因已被克隆出来。如果克隆没有表现期望的表型，但有重要的证据表明它已穿过整个位点，则证明期望序列是被步移覆盖了。在这种情况下，基因在 BAC/黏粒中被克隆时，基因被切短或基因在活动中呈隐性，因而可能导致转化失败。

7　真菌基因组分析相关数字资源

我们不可能在有限的空间内完全覆盖所有的真菌基因组分析方法。下面的网址会给大家提供更多相关信息。

http://www.cals.ncsu.edu/fungal_genomics/index.html

http://www.gene.genetics.uga.edu/

http://www.genome.ou.edu/fungal.html

http://www.fgsc.net/

第六章　真菌发育过程的细胞学分析

1　概述

丝状真菌是多细胞真核生物，在其整个生活周期中，要经历一系列形态分化过程，产生多种形态和功能不同的细胞类型。研究丝状真菌发育过程的方法涉及生长测定、显微观察和分化特征研究等。

2　丝状真菌生长的测定

真菌的生长是真菌重要的生理机能，真菌通过适宜的环境条件吸收营养物质，通过异化和同化等代谢过程，将营养物质转化为本身的细胞物质，因而增加了个体的体积，这是一切生理活动的综合反映。研究真菌生长是与其生理特性和生产实践密切结合的，所以，生长现象的研究有其理论上和实践上的意义。真菌的生长一般是由孢子萌发产生一短暂的牙管，菌丝从这个中心点向各个方向均等生长而发育成一个球形菌落。菌丝体的生长点是在菌丝的顶端，以其顶端延长的方式进行，菌丝的衰老部分是不能生长的。丝状真菌的生长主要是指菌丝体生长量的增加。

2.1　材料和用具

(1) 菌种：黑根霉(*Rhizopus stolonifer*)，亮白曲霉(*Aspergillus candidus*)，产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)。

(2) 培养基：PDA 培养基。

(3) 显微镜用具：目镜测微尺、镜台测微尺，培养皿，接种针，直尺，U 形培养管。

2.2　方法和内容

方案 1　菌丝顶端生长的测定

1. 培养黑根霉于 PDA 上，28℃培养 15h。

2. 用显微镜的镜台测微尺来校对目镜测微尺。镜台测微尺 100 格共长 1mm，每格为 10μm，标定目镜测微尺上每小格表示多少微米。

3. 将黑根霉平板放置于显微镜台上，在菌落边缘选择单根菌丝边缘，在低倍显微镜下聚焦。

4. 将目镜测微尺与菌丝平行，并选择菌丝开始出现侧枝的位置与目镜测微尺上的一条划线重合，这个点即为参照点。

5. 每隔一定时间测量一次菌丝的生长速度。

6. 观察 5 次后，根据时间和延长生长的长度绘制延长生长曲线，并求出生长速度：

$$S=L\times10^{-3}\times60/t$$

式中 S—速度/(mm/h)；L—长度/μm；t—时间/min。

方案 2　菌落生长速度的测定

1. 用接种针自斜面上生长的产黄青霉取少量菌丝，点种于平板中心，28℃温箱中培养。
2. 每隔 24h 在培养基底部量取菌落的直径。
3. 经 5 天后求出每小时的生长率(mm/h)，并绘制曲线，表示生长与时间的关系。

方案 3　直线生长速率的测定

1. 取装有 PDA 培养基的 U 形培养管 1 支。
2. 在长有亮白曲霉的斜面上，切取 1mm² 小块菌落，用移植器移入曲管的底部，两端同时放入。
3. 28℃温箱中培养，每隔 24h 在菌丝蔓延的尖端用记号笔做记号，测量其距离。
4. 5 天后计算真菌生长速率(mm/h)，并绘制生长曲线。

3　丝状真菌孢子的萌发

影响孢子萌发的因素很多，外因有温度、pH、营养物质的种类和浓度、光照等；内因有孢子的寿命、生命力、成熟度及休眠期等。孢子的萌发包括膨胀、局部极化、新壁物质的合成以及芽管的出现，这些过程伴随着细胞超微结构和生化水平的许多变化。下面介绍 2 种统计孢子萌发率的方法。

方案 4　真菌孢子的萌发测定

方法一：悬滴法

1. 在长好的稻瘟病菌的平板上加入 10ml 的水，洗下孢子，然后倾于清洁的离心管中，4 000r/min离心 3～4min，弃去上清液，再倒入水离心 1 次，然后将干净的孢子加一定的蒸馏水，悬浮，计数 10^6/ml。
2. 孢子稀释液以 20μl/滴接种于投影膜(杭州高科工贸公司)表面，2h 后，随机取 5 个视野，统计孢子萌发率。

$$\text{孢子萌发率}=\text{萌发的孢子数}/\text{孢子总数}\times100\%$$

方法二：液体摇床振荡萌发法

1. 25℃光照-黑暗(14h 光照和 10h 黑暗)培养 12～14 天，水洗收集稻瘟病菌分生孢子。3 层灭菌擦镜纸过滤孢子，收集孢子悬浮液。
2. 孢子悬浮液计数 10^7～10^8 个孢子/ml，接入 250ml 液体 CM 培养基中，28℃，180r/min 振荡培养 4h，制作玻片统计孢子萌发率。
3. 在高倍镜下随机挑取 5 个视野的平均值。计算孢子萌发的百分率。

4　稻瘟病菌细胞生物学分析

稻瘟病菌是丝状真菌分子生物学和致病机理研究的模式，具有典型的侵染过程。分

生孢子成功降落到水稻叶片上，分生孢子的尖端就能够泄放出粘胶，使其与水稻叶片的疏水表面紧密粘贴在一起；2h 之内，分生孢子萌发，产生芽管，芽管尖端形成一个“钩状”结构并肿大，继而诱发形成具有侵染能力的细胞结构——附着胞(appressorium)。随着附着胞的不断成熟，内部积累了高浓度的甘油，成熟附着胞可以产生 8.0MPa 的巨大压力，相继形成侵染栓，穿透寄主表皮，进入叶肉组织，形成次生菌丝体在寄主组织的胞内胞间传播，导致寄主退绿和组织坏死，最终表现明显的病斑；进而，在叶片表面产生分生孢子可以重新侵染寄主。在此以稻瘟病菌为例，介绍真菌发育过程中的各种细胞学分析方法。

方案 5　稻瘟病菌产孢培养、孢子收集和附着胞诱导培养

1. 取保存于滤纸片上的存放在－20℃的稻瘟病菌菌种，接种于 CM 固体培养基上活化。

2. 25℃光照-黑暗(14h 光照和 10h 黑暗)培养 12～14 天。

3. 水洗收集稻瘟病菌分生孢子。

4. 3 层灭菌擦镜纸过滤孢子，收集孢子悬浮液。

5. 5 000r/min 离心 10min，移去上清液。

6. 沉淀的孢子用无菌水稀释至孢子浓度为(1～1.5)×10^6孢子/ml。

7. 孢子稀释液以 20μl/滴接种于投影膜(杭州高科工贸公司)表面。

8. 25℃黑暗条件下静置培养，24h 后收集诱导形成的附着胞。

方案 6　稻瘟病菌侵染过程的组织病理学观察

试剂与溶液：

1. 棉蓝乳酚液　乳酚油中加入 0.05%～0.1%棉蓝。乳酚油配方为：乳酸 20ml、苯酚 20ml、20%甘油 40ml、蒸馏水 20ml。

2. 固定透明液　乳酚油：95%乙醇溶液＝1：2。

方法与步骤：

1. 准备稻瘟病菌的分生孢子悬浮液，浓度为 10^4～10^5孢子/ml。

2. 20μl/滴接种于生长 8 天的大麦叶片。

3. 24h、48h、72h、96h 各时间段取接种过孢子的叶片，在甲醇中脱色直至叶片透明。

4. 用固定透明液固定样品 10min。

5. 棉蓝乳酚液染色 10min 后，用固定透明液脱色。

6. 显微镜观察附着胞穿透情况。

方案 7　稻瘟病菌孢子、附着胞内脂质体、糖原的观察

1. 脂质体的观察(尼罗红染色)

试剂：50mmol/L Tris/马来酸缓冲液，pH 7.5；20mg/ml 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP，polyvinylpyrrolidone)；2.5μg/ml 尼罗红(9-diethylamino-5*H*-benzo[a]phenoxazine-5-one；Sigma)。

新鲜收集的孢子，接种于洋葱表皮或者塑料盖玻片上，孢子萌发，形成附着胞。将待检测的发育阶段的样品上滴上染色液数秒钟，用尼康显微镜（含有 EFD-3 B-2A 滤片），观察荧光。

2. 糖原（glycogen）染色

试剂：1ml ddH_2O 中包括 60mg KI 和 10mg I_2。

新鲜收集的孢子，接种于洋葱表皮或者塑料盖玻片上，孢子萌发，形成附着胞。将待检测的发育阶段的样品上滴上染色液数秒钟，显微镜下观察（Nikon Optiphot-2 microscope）。很快会看到黄褐色糖原沉积物，如果没有颜色变化，说明没有糖原积累。

3. 荧光染色　二乙酸荧光素（Bio Basic Inc.，East Markham，Ontario，Canada）贮存于丙酮溶液，浓度为 5mg/ml（4℃）。在使用时，吸取一定量的二乙酸荧光素的贮存液到原生质体悬液中，以达到终浓度 0.01%。将混合液在室温静置 5min 后，在荧光显微镜下观察原生质体发射荧光的情况；激发光波长为 488nm。

4. 细胞自噬过程　真核生物中，细胞自噬过程是进化上保守的过程。在细胞自噬过程中，双层膜的小泡——“自噬泡”的形成是这一过程的显著标志。自噬泡一旦完全形成，其外层膜与液泡膜融合，释放自噬泡内部的物质到液泡内腔，这些物质被降解成为大分子再利用。自噬过程可以分为 7 个独立的步骤：①感应（即小泡开始形成的感应）；②选择和包装物质；③小泡形成开始（成核现象）；④小泡扩张和完成；⑤修复；⑥小泡与液泡的融合；⑦液泡腔室内包裹物质。近年来，细胞自噬过程成为研究的热点，具有重大的生物学研究价值。针对酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、线虫（*Caenorhabditis elegans*）和盘基网柄菌（*Dictyostelium discoideumI*）的研究表明，细胞自噬过程对于细胞正常的生长和分化有着重要的作用；对于防御病原体的入侵，寿命的延长和阻止各种癌症具有作用；尤其是在营养缺乏的条件下，可以通过物质的再利用维持细胞的生长。

方案 8　细胞自噬现象的观察

1. 稻瘟病菌在液体 CM 培养 24h，用无菌水将培养基洗净，然后转移到 MM-N 中（含有 2mM PMSF），诱导 4h。

2. 显微镜下观察细胞自噬现象。

方案 9　酒精氧化酶活性测定

原理：

$CH_3OH+O_2 \rightarrow H_2CO+H_2O_2$

$H_2O_2+2ABTSred \rightarrow H_2O+2ATBSox$

氧化的 ABTS 为绿色，在 420nm 吸光值最大。

试剂：

1. 溶液 A　0.5mg/ml ABTS，10U/ml 辣根过氧化物酶，50mmol/L pH7.2 磷酸钾缓冲液。

2. 溶液 B　10mol/L 甲醇（40%，*V*/*V*，甲醇/水）。

注意：溶液 A 可以在 4℃，黑暗，保存 1 周；ABTS 光下不稳定。

方法与步骤：

1. 比色杯中加入(0.99－X)ml 溶液 A。

2. 加入 Xml 样品。

3. 平衡，使其稳定(至少 2min)；加入 10μl 溶液 B。

4. 测定吸光值的变化率(测定最大值)，斜率恒定，大约 45°。

5. 取 2 个不同体积的样品，进行上述操作。

6. 以每毫克或者每毫升蛋白中多少个单位的酶来表示酶活性。

计算酶活性：

$$\frac{1}{2\times 43.2\times V\times C}\times\frac{\Delta E}{\Delta t}$$

$\varepsilon 420=43,2cm^2\cdot\mu mol^{-1}$；$V$＝体积；$C$＝蛋白质浓度

注意：一分子 H_2O_2 氧化两分子 ABTS。

方案 10　冷冻替代用于电子显微镜观察

以酵母(镰刀)菌为例

1. 菌种接于 MY 液体培养基中，置于 28℃过夜培养。

2. 倒好的 MY 平板上放置无菌纤维素膜(5mm×7mm)，将一滴过夜培养的菌液滴于膜上，28℃培养 6h。

3. 将膜从平板上快速取下，立即浸入融化的 Freon23(用液氮预冷)中固定。

4. 样品置于无水丙酮中－85℃，2 周；其间更换 2 次无水丙酮。

5. 处理好的样品转移至 2%戊二醛＋2%OsO_4 中－85℃放置 12h，然后置于－20℃ 12h，0℃时每 45min 更换一次 2%OsO_4 共 2 次；再将样品放置在 2%OsO_4 中 21℃ 2h。

6. 将带有细胞的纤维素膜逐步在渗入 Epon-Araldite(用丙酮溶解)，至 Epon-Araldite 浓度达到 100%。

7. 将膜放于 2 层 Teflon 包被的玻璃片中间，70℃聚合反应 48h。

8. 镜检，检查细胞是否冷冻完全。

9. 染色。将 2%的乙酸双氧铀与异丁醇按 9∶1(V∶V)配成溶液(乙酸双氧铀和异丁醇分别过滤除菌)，在旋涡混合器中搅拌 30min 后立即使用。将在纤维素膜上生长的菌体收集至方格网中在该染色剂中染色 30min，然后在乙酸铅中染色 10min。

10. 电镜观察。

方案 11　细胞核，细胞壁和隔膜的染色

设备与试剂：

1. 平头镊子(用于取盖玻片)(Sigma 公司)。

2. 小科普林染色缸(盖玻片大小)(Baxter 公司)。

3. 封口膜(Parafilm)。

4. 固定液　3.7%甲醛，0.2%TritonX-100，50mmol/L 磷酸缓冲液 pH7。

5. Hoechst 溶液　1mg/ml Hoechst 33258(Sigma)水溶液；4℃避光保存。

6. Calcofluor(荧光染剂)溶液　1mg/ml Blankophor BBH 标准 SV-2460(Bayer)水溶

液;溶液中加入 1～2 滴 1mol/L 的 KOH。

7. Hoechst/Calcofluor 染色　2μl Calcofluor 溶液;1μl Hoechst 溶液溶于 5ml 水中;用薄片盖住。

8. 封固液　50%甘油,10%磷酸缓冲液 pH7;0.1% *n*-丙基没食子酸。

方法与步骤:

1. 用镊子(酒精灯烧过)夹取一个干净的载玻片放于无菌培养皿中。注意:有的研究者用 95%乙醇溶液,0.1mol/LHCl 预处理玻片,然后灭菌。但我们发现不是必须要这样处理。

2. 15ml 无菌离心管中加入 10ml 左右的培养基,再加入大约 10^6 个分生孢子,颠倒数次混匀。

3. 将含有分生孢子的培养基倒到盖玻片上。为了防止菌丝在盖玻片下面生长,用离心管(无菌)底部按压盖玻片以除去玻片底部的气泡。

4. 根据试验的不同选择适宜的培养时间和温度。

5. 将固定液倒入小科普林染色缸中,然后将玻片放入染色缸中 30min。注意:菌丝朝向很重要。我们常常放盖玻片目的是为了菌丝朝上。

6. 用一小烧杯水简单冲洗。

7. 在一块封口膜上滴 450μl Hoechst/Calcofluor 染色液。玻片置于染色液上,菌丝面朝下,其上盖一块铝薄片或小盒子避光。室温放置 5min。注意:我们将封口膜放在有机玻璃上,然后用直边去除多余部分,可以用 DAPI 代替 Hoechst。

8. 用一小烧杯水简单冲洗。

9. 载玻片上滴 7μl 封固液。小心将盖玻片放在封固液上以免产生气泡。

10. 将上述载玻片盖上铝薄片空气中干燥 1h。用指甲油将盖玻片周围封住。注意:如果封片之前盖玻片已经放了很长一段时间,那么将盖玻片放在 4℃以免变干。

11. 荧光显微镜下观察。

12. 4℃避光保存。染色时间长(几个月)可能观察更清楚。

第七章　丝状真菌的信号传导

1　概述

在真核生物细胞中也包括真菌，蛋白激酶是信号传导途径的重要成分。一般来讲，一连串的反向磷酸化/去磷酸化过程是信号传导的主要机制。这个机制提供了信号传导途径的专一性和多样性。虽然第二信使，例如钙离子途径、IP3、cAMP 及 G 蛋白也在一些信号传导情况中具有至关重要的作用，他们也是通过调节蛋白激酶的形式发挥其生理功能。

1.1　基因组中的蛋白激酶

通过对模式系统的研究，例如在芽殖酵母、裂殖酵母及黑曲霉中，已经证明蛋白激酶在几乎所有的细胞生长发育过程中起关键的作用，对内部生理信号和发育分化信息，以及外部刺激发生反应。这些激酶包括高度保守的细胞过程像细胞循环调节、检验点的控制、转录和翻译过程的调节等。还有真菌特异的涉及菌丝生长极性和分化的功能，细胞壁成分的代谢和产孢过程等。芽殖酵母基因组测序的完成，揭示了大约 2%的酵母基因编码蛋白激酶，代表了 30 多个基因家族，更加彰显了蛋白激酶在细胞调节和信号传导中的重要性。虽然从丝状真菌中分离出的蛋白激酶只有约 20 个，我们还是可以预见丝状真菌含有的蛋白激酶的数量必定超过酵母。

在过去的几年里，已经有数十个真菌的基因组序列测定工作完成，许多 EST 序列库也已经公布，众多的蛋白激酶基因将被揭示，全面了解这些基因的特性将指日可待。怎样充分利用这些序列信息资源快速揭示丝状真菌中信号传导的机制是我们在丝状真菌后基因组时代所面临的重要挑战之一。但毋庸置疑，真菌基因组序列数据库和生物信息工具在这些数据库中的应用将极大促进信号传导途径中的关键成分的研究鉴定。但是，采用正确的生理数据完整地建立一条信号传导途径，并阐明相应的分子机制也将是需要精巧的遗传学、细胞生物学和生物化学的有机结合的复杂研究过程。

信号传导研究很大程度上是蛋白激酶的调节研究。因此，我们在此将集中在丝状真菌中研究信号传导方面的主要方法和技术。由于蛋白激酶大多含有保守的结构和生化特性，本章将讨论蛋白激酶的一般性质，这些性质是我们所采用的研究方法的基础。在本章还将列出我们经常应用的方法来鉴定蛋白激酶的分子和生化特性，而高度保守的蛋白激酶如 MAP 途径的激酶，由于其在其他生物中的研究已经很完善，本章将不进行介绍。

1.2　蛋白激酶的一般特性

蛋白激酶是催化 γ-磷酸从 ATP 转移到其他蛋白基质的残基上的酶，如丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、组氨酸等氨基酸残基上。根据氨基酸接受磷酸根的特性，蛋白激酶通常可以分为 4 类：丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、酪氨酸蛋白激酶、双特异性蛋白激酶（丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸激酶）、组氨酸蛋白激酶。芽殖酵母全基因组序列测定的完成，显示类似于哺乳细胞，

真菌缺少真正的酪氨酸激酶。组氨酸激酶的结构与丝氨酸/苏氨酸激酶或酪氨酸激酶的相关性不大。组氨酸激酶运用一个磷酸基依赖系统将磷酸残基从一个组氨酸磷酸化介体转移到靶基质是一个天冬氨酸残基的氨基酸残基上，因此，组氨酸激酶也称为双组分系统。尽管双组分信号系统是细菌对外界刺激发生反应的主要机制，在真菌中这类激酶家族并不是广泛应用的信号途径，虽然一般认为这个系统在调节渗透压的过程中起作用。这样，在真菌中，信号传导途径主要通过丝氨酸/苏氨酸激酶介导。

根据稳定的和保守的蛋白残基的特征，所有蛋白激酶的催化结构域可以分为 12 个亚结构域。而且，丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸激酶在其激酶结构域中含有特异性的不同保守残基。因此，一个不明的蛋白激酶根据其与已知蛋白酶的相似性，可以很确实的预测是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶还是酪氨酸蛋白激酶。在结构拓扑学、调节及基物特异性方面，蛋白激酶催化结构域的相似性已经证明是很好的相似性指标。这样，对数据库中已知蛋白激酶的快速的序列相似性检索是一个界定真菌新蛋白激酶的很好的研究开端。真菌信号传导的主要研究内容是蛋白激酶的调节功能。本章节主要描述应用于丝状真菌蛋白激酶的实验方法。

2　蛋白抽提

蛋白激酶通过调节激酶的磷酸化状态，进而调控细胞的生理功能，在细胞信号传导过程中起着关键的作用。蛋白激酶的磷酸化可以使蛋白处于活化或抑制状态。因此，激酶抽提过程中需要保持蛋白的磷酸化状态，提取使用的缓冲液应该包含有蛋白磷酸酶抑制剂。

方案 1　构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)蛋白激酶的抽提

试剂：

1. YG 培养基　0.5%(*W*/*V*)酵母抽提物，1%(*W*/*V*)葡萄糖，20 mmol/L $MgSO_4$，微量元素混合物(1ml/L)，根据菌株加入所需的维生素混合物(1 000× 储存液)。

2. 微量元素混合物配方　$FeSO_4 \cdot 7H_2O$(1g/L)，$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$(8.8g/L)，$CuSO_4 \cdot 4H_2O$(0.4g/L)，$MnSO_4 \cdot 4H_2O$(0.15g/L)，$NaB_4O_7 \cdot 10H_2O$(0.1g/L)，$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$(0.05g/L)。依次称量和溶解每一种化合物，即为 1 000×储存液。每升储存液中加入 1ml 氯仿可以长期保存。

3. 终止液　160mmol/L NaCl，1mmol/L NaN_3(叠氮钠)，10mmol/L EDTA pH 8.0，50mmol/L NaF。

4. 蛋白抽提液　30mmol/L Tris-HCl pH 7.5，含有下列蛋白酶抑制剂：亮肽素(leupeptin)(13μg/ml)，大豆胰蛋白酶/胰凝素酶(soybean trypsin/chymotrypsin)抑制剂(13μg/ml)，抑肽酶(aprotinin)(13μg/ml)，*N*-甲苯磺酸酚丙氨酸氯化甲酮(TPCK，*N*-tosylphenylalanine chloromethyl ketone)(13μg/ml)，3mmol/L TAME(*Nα*-*p*-tosyl-L-arginine methyl ester)，7mmol/L 苯甲脒(benzamidine)，0.3mmol/L PMSF(pheylmethy-lsulfonyl fluoride)；含有下列磷酸酶抑制剂：100mmol/Lβ-甘油磷酸，20mmol/L NaF，1 mmol/L 钒酸钠(sodium vanadate)，20 mmol/L 对-硝基苯磷酸(*p*-nitrophenyl phosphate)，10nmol/L 微藻

素(microcystin),1μmol/L 冈田酸(okadaic acid);还含有 25mmol/L EGTA pH 7.5,7 mmol/L EDTA pH 8.0,0.2%(V/V)Nonidet P-40(诺乃洗涤剂),1 mmol/L DDT(dithiothreitol,二硫苏糖醇)。抽提液需要新鲜配制,PMSF 在碾磨时加入。

方法与步骤:

1. 按(2×10^6个/ml)的孢子接种孢子到 YG 培养基,在摇床(32℃,170r/min)中培养至指数生长期的早期或中期。

2. 在一层滤布(miracloth)上真空过滤收集菌丝,立即用冰冷的终止液洗一遍菌丝。

3. 用纸巾吸干菌丝后,用液氮瞬间冷冻菌丝。

4. 按每克冰冻菌丝加入 2.5ml 抽提液,在冰上用研钵和研杵碾磨菌丝 5min。

5. 离心 10min,14 000g,1℃。等量分装上清液,液氮冷冻长期保存。

6. 用微温水解冻冰冻的蛋白抽提液,重新离心抽提液。

7. 使用前使用 Bio-Rad 蛋白分析试剂测定蛋白浓度。

3 蛋白免疫沉淀反应

在蛋白粗提液中,检测蛋白含量或激酶活性通常使用快速的亲和纯化或免疫沉淀。

方案 2 NIMA 在大肠埃希菌(*E. coli*)中的表达和 His-tag 亲和纯化

试剂:

1. 含有 pET21a-NIMA 质粒的 BL21(DE3)pLysS 细胞。pET21a-NIMA 的构建过程含有 *nimA* 开放阅读框的 BglII-NotI 片段插入 pET21a 质粒,并使 T7 前导序列(leader sequence)位于 N 端、His-tag 序列位于 C 端。

2. HK 结合缓冲液 30mmol/L Tris-HCl pH 7.9,含有下列蛋白抑制剂:亮肽素(13μg/ml),大豆胰蛋白酶/胰凝素酶抑制剂(13μg/ml),抑肽酶(13μg/ml),*N*-甲苯磺酸酚丙氨酸氯化甲酮(TPCK)(13μg/ml),3mmol/L TAME,7mmol/L 苯甲脒,0.3mmol/L PMSF;并含有下列磷酸酶抑制剂:100mmol/Lβ-甘油磷酸,20mmol/L NaF,1mmol/L 钒酸钠,20mmol/L 对-硝基苯磷酸;还含有 0.2%(V/V)Nonidet P-40,10mmol/L 咪唑(imidazole),0.5 mol/L NaCl。

3. 1mmol/L IPTG(isopropyl β-D-thiogalactopyranoside),溶于水,过滤除菌,−20℃保存。

4. 洗涤缓冲液 30mmol/L Tris-HCl pH 7.9,60mmol/L 咪唑,0.5mol/L NaCl。

5. 洗脱缓冲液 20mmol/L Tris-HCl pH 7.9,0.5mol/L 咪唑,0.5mol/L NaCl。

6. 按照 per Novagen 的指导,用 1ml 包装的镍填充 His 结合树脂(nickel-charged His. bind resin)的柱子。

7. NIMA 储藏缓冲液 含有 15%甘油的 1×PBS 和磷酸酶抑制剂:100mmol/Lβ-甘油磷酸,20mmol/L NaF,1mmol/L 钒酸钠,20mmol/L 对-硝基苯磷酸。

方法与步骤:

1. NIMA 表达

(1) 挑一个 BL21(DE3)pLysS 大肠埃希菌的单菌落到 50ml LB 培养基,37℃培养过夜。

(2) 5 000g 离心 5min 收集菌体，用新鲜的 LB 培养基洗 1 次。

(3) 把细菌接种到 1L 新鲜的 LB 培养基中(每 2L 烧瓶装 500ml 培养基)，37℃培养，直到 OD_{600} 达到 0.5。

(4) 把培养物放在 20℃的摇床中，继续培养 10min。

(5) 培养基中加入 0.4mmol/L 的 IPTG 诱导 NIMA 表达，20℃继续培养 4h。

(6) 5 000g 离心 5min 收集菌体，4℃保存。

2. NIMA 纯化

(1) 用冰冷的 HK 结合缓冲液悬浮细胞，每 1L 培养物加 20ml 缓冲液。

(2) 在冰上超声破碎细胞，直到样品不再黏稠。

(3) 39 000g 离心 15min，1℃。

(4) 把上清液装载到填充 His 结合树脂的柱子上，以 1ml/min 的速度过柱。

(5) 用 15ml 的 HK 结合缓冲液洗涤。

(6) 用 15ml 的洗涤缓冲液洗涤。

(7) 用 15ml 的洗脱液洗缓冲脱，收集 1ml 组分的洗脱液。

(8) 用储藏缓冲液替换洗涤缓冲液，用 Centricon 30 离心柱(Millipore，USA)浓缩NIMA。

方案 3　蛋白质免疫沉淀(IP)

试剂：

1. KAB 缓冲液　50mmol/L Tris-HCl pH 7.5，10mmol/L $MgCl_2$，1mmol/L DDT。

2. TENN 缓冲液　50mmol/L Tris-HCl pH 7.5，5mmol/L EDTA pH 8.0，0.5%Nonidet P-40，150mmol/L NaCl，0.02%NaN_3(叠氮钠)。

3. 蛋白 A 琼脂糖凝胶 CL-4B 珠　1.5g 的蛋白 A 琼脂糖凝胶 CL-4B 珠悬浮在 10ml 的 TENN 缓冲液中，然后加 BSA 至 0.1%。珠子在摇床中摇过夜，4℃；然后离心洗涤 5 次，每次用 8ml TENN 缓冲液。珠子最后悬浮在 10ml 的 TENN 缓冲液中。

方法与步骤：

1. 在 1.5ml 离心管中，每微克蛋白抽提物加入 1μl NIMA 抗体(E-14)。用新鲜的 HK 缓冲液调节体积至 250μl，混匀。

2. 冰浴 2h，间断混匀。

3. 按 1μl 抗体 1mg 的比例加入蛋白 A 琼脂糖凝胶，混匀。吸取蛋白 A 琼脂糖凝胶珠前需先悬浮。

4. 在摇床内摇动样品 30min，4℃。

5. 7 000r/min 冷冻离心洗涤珠子，HK 缓冲液 3 次，KAB 缓冲液 2 次。

6. 免疫沉淀物然后可以和 2×蛋白上样缓冲液一起煮沸，用于 SDS-PAGE 和 Western 杂交；稀释后用于激酶分析。

4　凝胶阻滞试验(gel-shift assay)检测蛋白的磷酸化状态

蛋白激酶的活化或失活经常通过一系列的磷酸化或去磷酸化过程实现。在 SDS-

PAGE 胶中，磷酸化蛋白根据磷酸化程度的不同而具有不同的迁移率，与蛋白分子质量条带比较后可以判断其磷酸化程度。

方案 4 NIMA 磷酸化状态的凝胶阻滞试验

试剂：

1. TBST 溶液 20mmol/L Tris pH 7.5，500mmol/L NaCl，0.05%(*V*/*V*)Tween 20，0.02%(*W*/*V*)NaN_3(叠氮钠)。

2. 5%BSA，溶于 TBST 溶液。

3. 3%无脂牛奶，溶于 TBST 溶液。

4. PAP 缓冲液 25mmol/L Pipes 缓冲液 pH 6.0，亮肽素(13μg/ml)，大豆胰蛋白酶/胰凝素酶抑制剂(13μg/ml)，抑肽酶(13μg/ml)，*N*-甲苯磺酸酚丙氨酸氯化甲酮(TPCK)(13μg/ml)，3 mmol/L TAME，7 mmol/L 苯甲脒(benzamidine)，0.3 mmol/L PMSF。

5. NIMA 抗血清(E-14)，1∶200 稀释于含 5%BSA 的 TBST 溶液中。

6. PAP(Potato acid phosphatase，马铃薯酸性磷酸酯酶) 悬浮于的$(NH_4)_2SO_4$于 20 000g 离心 1min，4℃。PAP 重悬于 PAP 缓冲液，并在 1 L 的 PAP 缓冲液中透析过夜，4℃。加入甘油到 15%。PAP 分装，保存于−70℃。

方法与步骤：

1. 从 4mg 来自各个同步化细胞周期的细胞的不同阶段的蛋白抽提物制备的免疫沉淀的 NIMA。

2. NIMA 沉淀物的 SDS-PAGE 电泳，7.5%胶，16cm×20cm 胶，丙烯酰胺混合物(1.2g 甲叉双丙烯酰胺，30.2g 丙烯酰胺)。

3. 为了进一步确认 NIMA 磷酸化，在磷酸酶抑制剂(100mmol/L β-甘油磷酸，20mmol/L NaF，1mmol/L 钒酸钠，20mmol/L 对-硝基苯磷酸，10nmol/L 微藻素，1μmol/L 冈田酸，25mmol/L EGTA pH 7.5，7 mmol/L EDTA pH 8.0)存在或不存在的条件下，样品用 0.1U 的 PAP 处理 60min，30℃。在 SDS-PAGE 电泳前，用 KAB 从 NIMA 免疫沉淀物中洗掉 PAP(离心)。

4. NIMA 蛋白质电转移到硝酸纤维膜上。纤维膜用溶于 TBST 溶液的 5%(*W*/*V*) BSA 封闭 2h。纤维膜用 TBST 洗 4 次，每次 10min；在 1∶25 000 稀释于 3%无脂牛奶(溶于 TBST 溶液)的蛋白 A-辣根过氧化物酶共轭物(protein A- horse radish peroxidase conjugate)中温育 40min；用 TBST 洗 4 次，每次 5min。NIMA 蛋白按照说明书用化学发光法(chemiluminescence，ECI，Amersham)显色。

5 蛋白激酶的底物特异性分析

蛋白激酶的功能和生化分析通常需要测定激酶的活性。一般很难找到蛋白激酶的内源性底物。体内蛋白激酶的专一性主要由激酶在细胞内的位置和其他蛋白的临时的结合关系决定；体外蛋白激酶经常可以磷酸化许多没有生理相关性的蛋白质。因此，可以使用人工底物来分析蛋白激酶的活性。

方案 5　NIMA 激酶分析

试剂：

1. KAB 缓冲液　50mmol/L Tris-HCl pH 7.5，10mmol/L $MgCl_2$，1mmol/L DDT。

2. 激酶底物混合液（每个反应 5μl，以 β-酪蛋白为底物）　2.5μl 1 mmol/L ATP，2μl 酪蛋白（β-casein，10mg/ml），0.5μl[γ^{32}P]ATP（6 000Ci/mmol）。

3. 激酶底物混合液[每个反应 5μl，以缩氨酸 PLM（54～72）为底物]　2.5μl 1mmol/L ATP，2μl 缩氨酸 PLM（54～72）（4mg/ml），0.5μl[γ^{32}P]ATP（6 000Ci/mmol）。

4. 胶固定液　2 份甲醇，2 份去离子水，2 份乙酸。

方法与步骤：

1. NIMA 激酶分析（使用 β-酪蛋白为底物）

（1）用 KAB 缓冲液调节 NIMA 激酶免疫沉淀物的体积为 25μl。

（2）预热 NIMA 激酶和底物到 30℃。

（3）加入 5μl 的酪蛋白底物，用枪头混匀。各个样品间加入底物时间间隔为 10s 比较合适。

（4）在 30℃的水浴锅中进行激酶反应 10min。

（5）与加入底物时同样的顺序和同样的时间间隔加入 25μl 的 2×SDS 蛋白上样缓冲液，终止反应。煮沸样品 5min。

（6）在 12%（*W*/*V*）SDS-聚苯烯酰胺胶中电泳。当溴酚蓝移到离胶的边缘大约 2.5cm 时停止电泳。防止未结合的[γ^{32}P]ATP 污染电泳器具。仔细拆开电泳装置，切除含有未结合[γ^{32}P]ATP 的胶部分。

（7）在胶固定液中固定，使用真空干燥器干燥胶。

（8）磷酸化的 β-酪蛋白（激酶反应产物）通过放射自显影显色（autoradiography），定量用 PhosphoImager（Molecular Dynamics）检测或使用切割下的 β-酪蛋白条带的闪烁计数确定。

2. NIMA 激酶分析使用[PLM（54-72）为底物]

（1）同 A 一样开始激酶反应。

（2）用 1μl 的 0.5mol/L EGTA 终止反应。

（3）简单离心，转移 5μl 反应液磷酸纤维素 P81 滤膜（phosphocellulose P81 filter discs）上。

（4）在滤膜完全干燥后，用 75mmol/L 磷酸洗涤滤膜数次，直到用盖革计数器（Geiger counter）检测时空白处只有很低的背景。

（5）使用闪烁计数器测定滤纸中保留的放射性。

第八章　丝状真菌的细胞生物学技术

1　电子显微镜工作原理及其应用

与光学显微镜相比，电子显微镜具有更高的有效放大倍数和更高品质的分辨率，可以更好地揭示细胞的细微结构与功能。由于受波长的影响，一般光学显微镜的有效放大倍数不足 1 000 倍，不能清楚地观察细胞的细微结构，而电子显微镜的有效放大倍数可以达到 10 万倍以上。

电子显微镜的工作原理与光学显微镜类似，只不过采用了电子束和电磁线圈取代了光束和光学透镜，最后电子束照射在荧光屏上进行成像。电子显微镜在结构上分为高压电子枪与磁透镜、镜筒真空系统、冷却水系统、电源系统等。电子枪在数万伏高压下发射电子，穿越磁透镜进行聚焦。当加速电压为 50～100kV 时，电子束波长为 0.005 3～0.003 7nm，其最高分辨率可以达到 Å 数量级，图像有效放大倍数达到 10 万倍以上，是光学显微镜有效放大倍数的 100 倍以上。

上世纪中叶，扫描电子显微镜和透射电子显微镜相继问世并商业化，为细胞生物学研究提供了有力的工具。在生物科学领域，扫描电子显微镜主要用于生物微形态的观察，而透射电子显微镜主要用于细胞超微结构与细胞化学的研究。

透射电子显微镜与一般透射光学显微镜相似，主要用于观察细胞的超微结构。扫描电子显微镜与光学体视镜（解剖镜）相似，主要用于观察生物体表面的细微形态特征。如果配置了 X 射线衍射仪或电子能谱仪，也可以分析细胞的组分。

由于电子显微镜由灯丝在高压下发射电子，要求镜筒在高真空度条件下工作。因此，在通常情况下不能观察活的带有大量水分的生物样品。在透射电子显微镜中，还要求样品非常薄，这样才能生成清晰的、高分辨率的图像。因此，电子显微镜观察的样品均需要首先经过一系列复杂的样品处理环节。

在透射电子显微镜中，图像细节的对比度是由样品的原子对电子束的散射形成的。样品较薄或密度较低的部分，电子束散射较少，这样就有较多的电子通过物镜光栏，参与成像，在图像中显得较亮。反之，样品中较厚或较密的部分，在图像中则显得较暗。如果样品太厚或过密，则像的对比度就会恶化，甚至会因吸收电子束的能量而被损伤或破坏。

透射式电子显微镜镜筒的顶部是电子枪，电子由钨丝热阴极发射出，通过第一、第二两个聚光镜使电子束聚焦。电子束通过样品后由物镜成像于中间镜上，再通过中间镜和投影镜逐级放大，成像于荧光屏或照相底片上。

中间镜主要通过对励磁电流的调节，放大倍数可从几十倍连续地变化到几十万倍；改变中间镜的焦距，即可在同一样品的微小部位上得到电子显微像和电子衍射图像。为了能研究较厚的金属切片样品，法国杜洛斯电子光学实验室研制出加速电压为 3 500kV 的超高压电子显微镜。

扫描式电子显微镜的电子束不穿过样品，仅在样品表面扫描激发出次级电子。放在样

品旁的闪烁晶体接收这些次级电子，通过放大后调制显像管的电子束强度，从而改变显像管荧光屏上的亮度。显像管的偏转线圈与样品表面上的电子束保持同步扫描，这样显像管的荧光屏就显示出样品表面的形貌图像，这与工业电视机的工作原理相类似。

2　扫描电子显微镜样品制备的原理与方法

扫描电子显微镜在用途上类似于光学体视显微镜。其工作原理是电子束逐点在样品表面扫描产生二次电子，采集二次电子获得样品表面特征图像。与光学体视镜相比，扫描电子显微镜具有图像分辨率和有效放大倍数高，景深长的特点。

通常在观察生物样品时，扫描电子显微镜的电子枪加速电压为 5～20kV，分辨率约 10nm，成像放大倍数可高达 10 万倍。

2.1　扫描电子显微镜样品制备的要求

在通常情况下，要使所观察的样品能够在电子束照射下产生二次电子，样品表面必须具有良好的导电性。如果样品表面导电不良或与样品台之间接触不好，往往造成样品表面电子的大量积累与突发性放电现象，影响二次电子的成像。

大部分的生物样品都含有大量的水分，这一点显然不符合扫描电子显微镜的观察要求。因此，在样品制备过程中要彻底脱去样品中的水分；而且脱水过程不能够影响样品表面形态的变化。自然晾干的方法往往会导致样品表面凹陷和收缩变形，因此，是不可取的。其次，生物样品表面的导电性往往比较差，因此，要设法增加样品表面的导电性。所以，一般扫描电子显微镜样品处理包括：固定、脱水、临界点干燥、表面喷涂等环节。

2.2　样品的固定

固定的目的是最大限度地保持样品表面和内部的形态与结构的稳定。固定的原理是把样品中各种大分子相互紧密交联在一起。

固定使用的试剂主要包括甲醛、戊二醛、锇酸、高锰酸钾、乙醇、乙酸等。其中，醛类物质可以打开双键把样品中的不同分子以共价键连接起来，其效率对除了酯类物质均很有效。锇酸对酯类分子的固定非常有效。而高锰酸钾、乙醇、乙酸主要是蛋白质凝聚型的固定剂，可以杀死细胞并较好地使之维持原有形态结构。

目前，最广泛使用的是戊二醛-锇酸双固定法。即在不影响观察目的的情况下，把新鲜样品切成尽可能小的小块，然后在 2.5%～4%戊二醛溶液中 4℃下固定 3～12h，缓冲液彻底冲洗后，在 1%锇酸中室温下固定 2h。这样，各种细胞组分可得到比较完全和均衡的固定效果。

在固定时有些样品内部可能存在气泡，影响固定液的渗入和固定效果，因此要采用负真空的方法去除气泡。一般可以采用注射器抽出容器中的空气，排除样品中的气泡。时间以放气后样品可以自动沉入固定液底部为限。

有时候新鲜的样品非常柔软，不便切割成小块。这时可以在 4℃下把整个样品浸入固定液固定一定时间，等样品变硬时再进行切割。为了减少切割对样品结构与形态的破坏，应使用新的双面刀片，并利用两个刀片相向进行，以减少挤压变形。

如果样品本身是干燥的或具有坚硬的外壳，固定甚至以后的脱水环节都是可以省略的。如果复水，反而会造成形态结构的变化。因此，越是新鲜和柔软的样品，其固定也越为重要。

样品固定的推荐步骤如下：

(1) 取一 10ml 安瓿，加入约 5ml 含 2.5%戊二醛的磷酸盐缓冲液(pH7.2，50mmol)。

(2) 用新的双面刀将样品切成不大于 5mm 的小块，迅速放到固定液中。

(3) 如果样品漂浮在固定液表面不能下沉，盖上瓶盖，用注射器抽出瓶内空气，保持 5～20min，放气，看样品是否沉下。如果没有沉到溶液底部，继续抽气。

(4) 将沉下的样品放入 4℃冰箱，样品大小固定 3～12h。值得一提的是，绝大部分的样品是可以固定更长的时间而不会对观察结果造成不良影响。

(5) 吸除戊二醛溶液，加入 5ml 磷酸缓冲液漂洗样品。共 3 次，每次 5min。

(6) 吸除磷酸缓冲液，在通风橱中加入 1%锇酸固定液(用 ddH_2O 或磷酸缓冲液配制均可)，室温下放置 2h。(锇酸具有强烈挥发性并有剧毒，必须在通风橱中操作!)

(7) 吸除锇酸固定液并将废液加入食用油瓶，磷酸缓冲液漂洗，共 3 次，每次 5min。其中前两次漂洗的废液也加入食用油瓶中。

2.3 脱水与临界点干燥

脱水处理主要是用乙醇、丙酮等水溶性小分子有机溶剂取代样品中的水分，最后在一定条件下使这些有机溶剂挥发，产生无变形的干燥样品。

通常的做法是用系列梯度丙酮溶液(30%、50%、70%、90%、100%)逐步置换样品中的水分，直至水分完全被丙酮取代；再用乙酸异戊酯逐步取代丙酮；然后样品放在 CO_2 临界点干燥仪中进行干燥。之所以经过多次有机溶剂的取代，主要是为了脱出水分，并且使液态 CO_2 容易渗入样品。

在 CO_2 临界点干燥仪中，样品中的乙酸异戊酯全部被液态 CO_2 所取代。当加热到 34℃后，让 CO_2 在约 70 大气压力下在不产生表面张力的情况下缓慢蒸发，就完好地保存了样品固有的表面形态结构。

脱水与临界干燥的推荐步骤如下：

(1) 固定好的样品分别用 30%、50%、70%、90%、100%的丙酮水溶液脱水，每步 10～30min，其中 100%丙酮重复脱水 3 次。

(2) 分别用 30%、60%、100%的乙酸异戊酯逐步置换样品中的丙酮，每步 1～2h。

(3) 把样品迅速放入特制的样品篮中，记住编号，放入 CO_2 临界点干燥仪的样品室中。

(4) 打开临界点干燥仪开关，把样品室温度调到低于室温 10℃的位置。

(5) 打开 CO_2 进气开关，让 CO_2 进入样品室。然后放气。反复几次使样品室温度达到设定温度。

(6) 打开 CO_2 进气开关，让 CO_2 进入样品室，直到 CO_2 液面达到样品室体积的 60%。关掉进气开关。

(7) 把样品室温度调到 25℃。当温度到达后，保持 20min，让 CO_2 液体充分置换样品中的乙酸异戊酯。

(8) 把样品室温度调到 34℃。当温度到达后，保持 5min。

(9) 开 CO_2 放气阀门，使放气速度为 1ml/s。约 1h 后干燥结束。

2.4　样品表面喷涂

样品表面喷涂的目的是增加表面的导电性。一般是利用真空镀膜设备在高真空条件下给样品表面溅射上一薄金属层，主要是铂金或黄金。

样品表面喷涂的推荐步骤如下：

(1) 打开喷涂仪开关，开始抽真空。

(2) 关闭样品室真空阀，打开样品室，放入样品。关闭样品室并打开真空阀。

(3) 当真空度达到一起标志的要求后，打开高压开关，把电流开关调到 5 左右，定时器调到 5min。

(4) 喷涂好的样品可以进行电镜观察。如果样品与样品台接触不好，可以用导电胶粘结。

2.5　特殊样品的处理方法

2.5.1　孢子与孢子堆的样品处理

对于气传的单个的孢子形态观察，可以直接粘到样品台上，喷涂后进行观察。如果进行固定和脱水处理，孢子往往会吸水膨胀而出现肿胀和饱满，和固有形态不一致。有些孢子细胞壁比较薄，水分含量高，很容易失水凹陷而变形。对于这类孢子，可以直接在环境模式下进行直接观察。当然，直接观察的图像清晰度和分辨率相对较低，放大倍数有限。

对于卵孢子，样品处理相对繁琐。一般首先需要对卵孢子进行分离，利用 0.22μm 的微孔滤膜过滤，让孢子吸附在微孔滤膜表面，然后剪下微孔滤膜进行处理。这种处理要注意标注样品的正反面。而且卵孢子变形的几率很高。许多薄壁的分生孢子也很容易变形。

对于液体培养的菌丝，注意挑取的菌丝团不能太大、太多。

2.5.2　组织与细胞间真菌的样品制备

对于观察组织与细胞间真菌的样品，一般最好先把较大的样品块在 4%戊二醛固定液中 4℃预固定数小时至数天，然后再切到要观察的剖面进行精细取样处理。如果观察活体寄生菌，需要对样品做较长时间的锇酸溶液固定，以便清楚地观察寄主细胞膜和病原菌吸器。

3　透射电子显微镜样品制备的原理与方法

在透射电子显微镜中，高压电子束要穿透样品而成像，因此要求样品的厚度很薄，一般为 6～9nm。所以，大部分样品需要经过一系列的处理制成超薄切片，以便进行超微结构分析。如果研究细胞内大分子组分，还要进行各种不同的细胞化学处理，从而标记细胞组分的合成与分布位点，揭示其在细胞代谢中的功能。

3.1　组织与细胞的固定

由于透射电子显微镜观察的是细胞的超微结构，即细胞的各种亚结构，因此，如何保持

细胞内部原有的结构、防止细胞自溶与降解非常重要。

3.1.1 固定剂

常用的固定剂包括戊二醛、锇酸、多聚甲醛、高锰酸钾等。戊二醛与细胞起反应的主要是戊二醛单体，两个醛基可与细胞成分发生交联，对糖原和核蛋白，尤其是对微管和内质网等膜系统以及细胞基质有较好的固定作用；对组织的穿透力强，可固定数毫米的组织块；可保存某些酶的活性，但对脂质不起固定作用。用戊二醛固定的组织、样品在固定液中 4℃下保存数周至数月其超微结构不会产生明显变化。

锇酸(OsO_4)的主要作用是固定蛋白质。细胞中核酸和糖大部分都与蛋白质呈复合的形式，因而，锇酸几乎能和所有的细胞成分结合。锇酸与脂肪的不饱和脂肪酸链结合，形成脂肪/锇复合物，因此，对脂肪呈现良好的保存作用。但是，锇酸不能保存糖原，对微管的固定作用较差。另外，锇酸在组织中扩散慢，细胞穿透力较差，要求被固定的组织块不能大于 1mm。此外，锇酸分子的密度大，具有电子染色作用，与锇酸结合多的部分呈现灰黑色。

多聚甲醛溶解后水解成为甲醛。甲醛穿透力强，但没有分子间的交联作用。可较好地固定大块组织。甲醛可保存蛋白质、脂类和一些糖原，不能保存多糖。多聚甲醛固定的组织呈可逆反应，因此漂洗时要注意。

为了快速保存细胞固有微细结构，固定液必须用一定渗透压和 pH 的缓冲液配制。这样能够维持细胞一定的 pH 环境，防止在固定期间细胞或细胞器肿胀或收缩，同时防止固定期间某些物质的沉淀或抽出。常用的缓冲液有磷酸缓冲液、二甲胂酸缓冲液和巴比妥-醋酸缓冲液，浓度一般为 50～100mmol。

常用的戊二醛浓度为 2.5%～4%；锇酸的浓度为 1%～2%；高锰酸钾通常为 2%～4%；甲醛通常为 1%～3%。

3.1.2 固定的时间与温度

样品固定的时间与温度主要取决于样品的性质、体积大小和固定液的成分。固定时间过长，固定液将抽出样品中的某些成分，增加人工损伤。如戊二醛长时间固定会形成一种髓鞘样图形；锇酸长时间固定会抽出细胞质基质的许多蛋白质并使组织变硬难以切片；而固定时间过短，则固定不充分、不完全，导致细胞结构模糊。

一般来说，质地致密、体积较大的样品（如致密的菌丝体、菌核、孢子盘等）固定时间要相对长点，疏松和体积较小的样品（如人工培养基上培养的菌落、孢子等）固定时间要短。一般情况下，固定的温度为 4℃最佳。因为低温可以有效降低样品细胞中水解酶活性，减慢细胞自溶。但低温下固定液的渗透慢，固定时间应相对延长。固定温度高样品固定速度快，但样品细胞中水解酶活性强，容易发生细胞自溶。

3.1.3 常规的固定方法与程序

最常规的固定方法是戊二醛-锇酸双固定法，即所谓的通用固定法。

(1) 前固定：将样品浸入 2.5%戊二醛（100mmol/L 磷酸缓冲液，pH7.2）或 2%多聚甲醛加 2.5%戊二醛（100mmol/L 磷酸缓冲液，pH7.2）4℃固定 6～12h。

(2) 漂洗:用磷酸缓冲液(100mmol/L,pH7.2)4℃漂洗,共3次,每次15min。

(3) 后固定:1%锇酸溶液(100mmol/L磷酸缓冲液,pH7.4)室温或4℃固定1～2h。(锇酸剧毒,本步骤须在通风橱内进行!用过的锇酸和前2次漂洗液倒入有食用油的瓶子中!如果有溶液溅入眼睛或皮肤上,马上用清水彻底冲洗!)

(4) 漂洗:用磷酸缓冲液(100mmol/L,pH7.2)4℃漂洗,共3次,每次15min。

3.2 脱水

脱水的目的是用有机溶剂取代组织与细胞中的水分,继而用有机的单体树脂分子取代有机溶剂,从而在一定条件下把生物样本聚合成为具有一定硬度的塑料块,以便下一步进行超薄切片。

最长使用的脱水剂是丙酮和乙醇。在脱水过程中,脱水剂需从低浓度到高浓度逐步过渡,以免因组织急骤收缩而出现人工损伤。常规脱水溶液为丙酮或乙醇水溶液,依次从30%、50%、70%、90%、100%,每步室温下10～15min。100%丙酮或乙醇一般重复3次,以彻底脱出组织中的水分。在多雨潮湿的季节,往往需要往试剂中加入干燥剂纸包,防止因脱水不彻底导致包埋失败。

3.3 包埋

包埋的目的是用包埋剂支持整个样品的结构,并形成特定的机械性能,以便于进行超薄切片。

理想包埋剂应该是:单体时黏度低;聚合均一,体积变化小;容易切片;在电子束轰击下稳定;电子透明度好,不形成背景反差;易溶于脱水剂。

包埋剂种类主要包括环氧树脂类(Epon 812、Quetol 812及国产环氧树脂618)、丙烯类树脂(Lowicryl、LR White及LR Gold)、GMA等。

一套包埋剂往往包含多个组分,主要是单体分子、交联剂、氧化剂等。其中单体分子和交联剂的比例决定聚合后塑料的硬度,而氧化剂的多少决定聚合的速度与聚合后塑料切片特性。包埋剂硬度要求与样品组织特性一致,如果软硬不一,会增加切片的难度和切片的质量,导致切片困难和薄厚不均。此外,过量的氧化剂往往导致塑料块发脆,增加切片的难度。

彻底脱水后的样品首先要使用包埋剂进行渗透和彻底的置换,即用包埋剂置换样品内的脱水剂。置换一定要彻底,否则不能很好地聚合,不能进行顺利地切片。

一般情况下,可用脱水剂和包埋剂2∶1、1∶1、1∶2混合液、纯包埋剂逐步置换,也可用环氧丙烷作为中间溶剂置换脱水剂,再用环氧丙烷与包埋剂1∶1混合液和纯包埋剂置换。把样品放在慢速振荡器上渗透效果更佳。每步渗透的时间一般为1～2h,并使样品在纯的包埋剂中过夜。如果样品渗透困难,可以适当延长时间。

渗透完成后,把样品装入特制的胶囊或0.5 ml的塑料离心管、橡胶包埋板孔中,加满包埋剂。然后根据不同包埋剂的要求,放入特定温度的温箱中进行聚合或放入有适当剂量紫外线照射的箱子中聚合。聚合时间因包埋剂而异,高温聚合一般6～48h,紫外线聚合一般72～120h。

3.4 超薄切片及其染色

聚合以后的样品经过手工或机器的修正后，首先在超薄切片机或半薄切片机上进行半薄切片，并在光学显微镜上确定要进行超薄切片的位置，然后在超薄切片机上进行超薄切片，厚度一般为 60～90Å。超薄切片收集在铜网（相当于光学显微镜观察用的载玻片）上，进行染色和观察。

一般超薄切片的染色采用醋酸铀和柠檬酸铅双染法，细胞的不同组分有不同的着色。一般是用 2%醋酸铀和 1%柠檬酸铅各染 10min。每次染色后，用 ddH_2O 彻底冲洗干净。在柠檬酸铅染色时，空气中或呼出的 CO_2 很容易污染染色液，形成碳酸铅颗粒沉淀，污染切片。因此，一般在培养皿中进行染色，并且在切片周围放置稍许 NaOH 结晶。

4 电镜细胞化学技术

细胞化学（cytochemistry）是研究细胞的化学成分，及其在细胞代谢活动中的变化和定位的技术。即在不破坏细胞形态结构的状况下，用生化的和物理的技术对各种组分做定量的分析，研究其动态变化，揭示细胞代谢过程中各种细胞组分的作用。

根据研究手段的不同，细胞化学又可以细分为细胞化学（cytochemistry）和组织化学（histochemistry）。前者是特指在借助电子显微镜技术的基础上进行的工作，而后者特指利用一般光学显微镜和激光共聚焦显微镜技术基础上进行的研究。在实质上二者没有本质的不同。

4.1 细胞化学技术的发展

细胞中包含有各种各样的有机组分，这些不同的细胞组分对很多染料的着色特性有不同表现，这就构成了最早期的细胞化学技术。19 世纪初，人们发现了淀粉和碘呈现特异的蓝色反应，碘与蛋白质的黄色反应等，从而开始了细胞特异性组分研究的历史。随后，相继发现了利用普鲁士蓝和硫化胺显示细胞中的铁；甲紫显示糖蛋白；天竺牡丹显示肥大细胞、唾液腺黏液；杂硫氧苯染料如亚甲蓝、硫堇、亚甲绿、甲苯胺蓝、天青蓝等对多糖的异色性染色等。截至 20 世纪 60 年代，以特异性染料为基础的染色技术一直是细胞化学的主流技术。

随后，酶细胞化学技术（enzyme cytochemistry）得到了迅速的发展。即利用酶促反应的原理，检测其特异性底物，从而确定活体组织细胞中各种酶的活性及其分布位点。这些酶主要是一些水解酶和氧化酶，如各种 ATPase、过氧化物酶等。在各种 ATPase 活性分析中，在新鲜的组织块中加入酶促反应的底物和可溶性重金属盐，利用酶促反应产生的磷酸根粒子（PO_4^{2-}）与重金属反应，形成深色的不透明的沉淀来显示酶活性的大小与部位。在过氧化物酶分析中，一般是加入分子质量相对较大的偶氮类物质，它们与酶促反应产生的活性氧发生氧化反应，形成聚合的深色的大分子沉淀。

20 世纪 70 年代开始，免疫学的快速发展促使免疫细胞化学技术的诞生并逐渐成为主流，其原理是利用抗体特异性识别细胞中的抗原物质。一般把荧光物质、水解酶、胶体金等能够被光学和电子显微镜识别的标记物交联在抗体上，从而显示抗原在细胞中的位点及相对含量。许多重要的结构组分，如细胞壁蛋白、细胞骨架蛋白、钙调素蛋白及防卫反应蛋白

等均是利用这项技术完成的。

随后，免疫细胞化学技术被进一步演绎和发展，探针由单纯的抗体扩大到包括水解酶和各种各样的蛋白。这些探针可以检测其相应蛋白的互作蛋白或受体蛋白。

当然，与之原理相同，但以荧光显微镜、普通光学显微镜为基本工具的免疫组织化学也越来越显示出其广阔的应用前景。

随着功能基因组学的发展，基因最终功能的验证必然需要细胞学方面的证据支持。本节，我们将重点介绍免疫细胞化学技术中应用最广的免疫金标记技术。

4.2　免疫金标记技术

免疫金标记技术就是利用纳米级大小的金颗粒作为标志物，在其表面交联上抗体等探针蛋白，用这种金-蛋白复合体去探测细胞中能够与探针蛋白相互作用的蛋白或抗原的分布位点及其相对含量。其主要技术环节包括胶体金的制备、胶体金探针的制备、生物样品的制备、标记实验以及标记结果的观察分析。

4.2.1　胶体金的制备

根据不同的制备方法，可以制备出直径 1～500nm 的胶体金粒子，但作为免疫标记探针，其直径应在 3～30nm 范围内。

在氯化金($HAuCl_4$)水溶液中加入还原剂使之还原并聚积形成胶体金粒子。使用不同种类、不同剂量的还原剂，可以控制所产生的粒子大小。即粒子大小取决于反应溶液中最初还原剂和还原核的数量(表 8-1)。还原剂浓度越高，核浓度也越高，氯化金的还原也就从更多的还原中心开始，因此，产生的胶体金粒子数量越多，体积也越小。粒子直径每增加一倍，数量减少为原来的 1/8。

以柠檬酸钠和单宁酸作还原剂，能够制备大小相对一致、直径 3～16nm 的胶体金。因此，一般胶体金探针均使用该方法进行。但该方法制备的胶体金粒子直径范围较窄，而且残留的多聚单宁酸残基往往干扰某些蛋白与金粒子的结合。此时，在溶液中添加 0.1%～0.2%H_2O_2能够去除这些残基。双标记或制备 5～10nm 的胶体金时建议使用该方法。

利用柠檬酸为还原剂，可以制备 12～150nm 直径的胶体金(图 8-1)。但制备大体积的胶体金时，胶体金粒子的误差也同时增加。因此做单标记时，建议使用该方法制备 12～16nm 直径的胶体金(表 8-2)。

除了上述方法外，也可以用磷作为还原剂来制备 5nm 的胶体金，它避免了单宁酸残基的问题，但所形成的金粒子体积变化较大。磷易燃且有毒，制备的残液需进一步处理，故该方法已经很少使用。

氯化金极易吸湿，故一般均以小剂量密封保存(0.5g 或 1g)，因此在配制氯化金溶液时一次配完，暂时不用的可以用 1.5ml 试管分装为 1ml 保存(－20℃)。注意各种玻璃器皿一定要洗净并用 ddH_2O 多次冲洗，有条件时可硅化处理(1%双氯硅烷/氯仿浸泡 1h，烘干)。配制各种试剂时均使用 ddH_2O，随后再用 0.22μm 微孔滤膜过滤后使用。三角瓶可反复多次使用，不用时应密封保存，以防污染。

制备好的胶体金保存寿命较长，可 4℃保存 6 个月以上或室温下保存 1～2 个月。当出现明显悬浮物或沉淀后表示已不可再用。但无论如何，在保存较长时间后应进行镜检，如

出现大量胶体金粒子凝集，说明已经过期。

4.2.1.1 推荐制备程序 1

单宁酸/柠檬酸钠法制备 3～16nm 胶体金。

(1) 取一 250ml 三角瓶，加入 79ml ddH_2O 和 1ml 1%氯化金，预热至 60～70℃。

(2) 取一 50ml 烧杯，加入 4ml 1%柠檬酸钠，然后根据所制备金粒子体积大小加入不同用量的单宁酸及等量的 25mmol/L K_2CO_3。预热至 60～70℃。K_2CO_3 的作用是保持溶液的中性 pH。因此，如果单宁酸的量少于 0.5ml 时，对 pH 的影响不大，K_2CO_3 可以省略。

(3)将上两种溶液迅速混合并充分混匀，加热至沸并保温 10min。自然冷却。

单宁酸/柠檬酸钠用量与制备的胶体金直径的关系表 8-1。

表 8-1 还原剂用量与制备的胶体金直径的关系

柠檬酸钠(ml)	单宁酸(ml)	胶体金(nm)	柠檬酸钠(ml)	单宁酸(ml)	胶体金(nm)
4	5 000	3	4	120	8
4	2 000	4	4	70	10
4	500	6	4	10	16

4.2.1.2 推荐制备程序 2

柠檬酸三钠法制备 12～30nm 胶体金。

(1) 取 250ml 三角瓶一个，加 100ml ddH_2O 及 1ml 1%氯化金，加热沸腾。

(2) 取不同量的 1%柠檬酸钠加入上述溶液中。混匀，再保持沸腾 30min，溶液颜色首先变黑，再逐渐变红，粒子体积较小时，溶液呈橘红色，而粒子体积较大时，则颜色偏向紫色。

柠檬酸钠用量与制备的胶体金直径的关系见表 8-2。

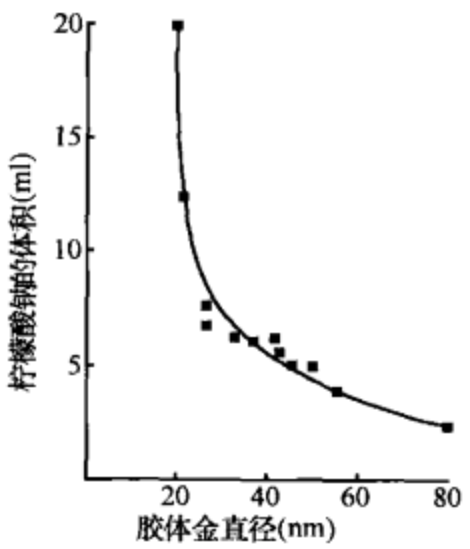


图 8-1 胶体金颗粒直径与柠檬酸钠的关系曲线

表 8-2 柠檬酸钠用量与制备的胶体金直径的关系

柠檬酸钠(ml)	胶体金(nm)
5	12
4	16
3	24
2.8	30

注意：①由于使用试剂质量及其他方面可能存在的误差，以及制备过程中的其他问题，胶体金粒子的大小及一致性与理论值可能有偏差，因此，在制备完成后必须进行镜检。如出现粒子体积偏差太大，粒子凝聚，粒子边缘不清晰等问题，须重新制备。②胶体金溶液最好保存在 4℃冰箱中；也可保存在室温下，一般可保存 1～2 个月。但决不可保存在 0℃以下，否则金粒子会发生凝聚。

4.2.2　蛋白-金复合体的制备

一般认为胶体金粒子表面为一层 $AuCl_2$，因此，粒子表面带有负电荷，这种负电荷粒子之间相互排斥，形成稳定悬浮的胶体金溶液。

金颗粒表面可以包被一层生物大分子(如蛋白)来稳定和保护这些粒子，以免受外来电解质的影响而相互凝聚在一起。胶体金粒子对蛋白的吸附作用取决于 pH，这是因为蛋白的净电荷取决于溶液的 pH，在 pH＝pI 时为中性。由于在 pH＝pI 时蛋白溶解度最小，因此，这时它水化程度最小，最容易吸附到疏水的金粒子表面。但在实际的胶体金探针制备中，一般胶体金调整为 pH＝PI＋0.5，这样蛋白带正电，有利于结合更稳定。

胶体金探针所用蛋白必须要经过前处理，其目的在于：

(1) 去除高浓度的盐分，高浓度的盐分往往干扰蛋白与胶体金的吸附结合，或导致胶体金粒子的凝聚，这一步往往在低浓度缓冲液中进行。

(2) 使蛋白分子尽量分散为单体，冻干蛋白或高浓度蛋白溶液中蛋白分子往往凝聚为多聚体大分子，可同时与多个胶体金粒子结合，影响标记的灵敏度和定量分析。

(3) 使蛋白具有适当的分子质量。蛋白分子质量过小(30kDa)，形成的蛋白复合体往往是不稳定的，可短时间内失活。而分子量过大时，被认为影响探针的灵敏度，特别是已知蛋白的结构与活性中心的情况下，去除对活性有影响的结构部分是提高标记灵敏度，延长探针寿命(防止凝集)的有效办法。把分子质量过小的蛋白与其他蛋白(如 BSA、牛血清蛋白等)结合后，能制备出稳定性更佳的探针。

当蛋白前处理完成后，接着要确定胶体金与蛋白结合的最佳 pH。对于理化性质不确定的蛋白这一步尤为重要。过量的蛋白与不同 pH 的胶体金结合后，只有某一特定 pH 能够形成结合最稳定的探针。在高浓度电解质(如 NaCl)作用下不会凝聚。不同蛋白的适宜 pH 范围的宽窄大不相同。一般选择最小适宜 pH 为最佳 pH。但有些探针的实际情况并不完全如此，最稳定化的探针并不完全代表活性最好。这要靠实验验证。

在确定最佳 pH 后，最后要确定最小蛋白量，即能够形成稳定探针的蛋白的最小量。如果在制备探针时加入太多的蛋白，不仅造成浪费，而且更为严重的是容易造成探针凝聚，并严重影响标记活性。因为探针溶液中的游离蛋白容易抢先与标记位点结合，起到“封闭”(blocking)作用，而胶体金探针标记不上。在标记位点稀少、被标记物含量较少的情况下要特别注意。

这里需要特别指出的是，使用不同直径的胶体金与同一蛋白结合时，除了蛋白量完全不同外，往往最佳 pH 也有一定变化。

因此，在探针制备的每一环节应随时监测探针对分布情况、负染结合及活性。

4.2.2.1　抗血清的前处理

一般抗血清中 IgG 的含量为 10%～25%，而绝大部分为其他蛋白。用抗血清直接制备探针，其标记活性与特异性均不理想。因此，需去除其中多数杂蛋白。但处理环节不宜太繁，在实验室设备与经验缺乏的情况下更是如此，否则会导致 IgG 活性的大幅降低。如果你的实验室在蛋白纯化方面有很强的技术支持，高度纯化后效果会更好。

大量工作表明，只要用硫酸铵沉淀就可以得到足够纯度及高活性的 IgG 蛋白。其基本步骤如下：

(1) 取抗血清 0.2ml。

(2) 加生理盐水(0.85% NaCl)0.3ml,混匀。

(3) 逐滴加入饱和$(NH_4)_2SO_4$ 0.5ml,充分振荡混匀,4℃静置 1h。

(4) 10 000r/min 离心 20min,弃上清液。

(5) 加 0.5ml 生理盐水重悬浮,混匀。

(6) 逐滴加 0.25ml 饱和$(NH_4)_2SO_4$,充分振荡混匀,4℃静置 1h。

(7) 10 000r/min 离心 20min,弃上清液。

(8) 重复(5)~(7)步骤一次。

(9) 加生理盐水 0.5ml 重悬浮,混匀。

(10) 生理盐水中透析 12~24h。

(11) 在 0.2mol/LpH 9.0 硼酸缓冲液透析 12~24h。

(12) 分装,即将使用时 4℃保存,备用-20℃保存。

为最大限度地保持抗体活性,整个过程应在 4℃下进行。对于冻干抗血清或长时间保存的血清,将生理盐水透析改为 3M KCNS 透析,促使聚合的多聚体解聚。如果抗血清效价较低时,不宜准备胶体金探针。

4.2.2.2 亲和纯化抗体的处理

亲和纯化抗体多是一些商品化的通用抗体,即二抗。一般为羊抗兔、羊抗鼠或羊抗人的抗体。这些抗体一般有两个问题,一是 IgG 分子往往聚集为多聚体分子,二是往往含有较多的盐分。因此,前处理的目的在于脱盐和解聚。

其基本步骤如下:

(1) 将亲和纯化抗体用生理盐水稀释为 0.5~1mg/ml 浓度。

(2) 在 3mol/L KCNS(硫氰酸钾)溶液中透析 12h。

(3) 在 2mmol pH 9.0 的硼酸缓冲液中透析 12h(更换透析液数次)。

(4) 分装备用。

其他蛋白可参考此方法进行。但注意后一种透析液的 pH 应与交联时 pH 一致。在实际运用中,一般省略去 3M KCNS 透析这一步,特别是当蛋白分子质量较小,且为非糖蛋白时。我们建议在制备通用探针(如二抗 IgG、蛋白 A、蛋白 G、链亲和素等)时,严格使用该方法,而制备直接标记探针时,也可以忽略处理步骤。

4.2.2.3 IgG Fab 片段的制备

一般来说,体积较小的探针具有相对较高的标记活性。主要原因在于胶体金颗粒较小时有利于在标记溶液中的扩散运动;在胶体金直径一定时,蛋白分子质量越小,金表面吸附的蛋白分子越多,活性位点也越密集,也容易与靶位点结合(表 8-3)。

表 8-3 蛋白 A 和蛋白 G 与不同抗体之间的亲和性

抗体来源	IgG 类型	与蛋白 A 的亲和性	与蛋白 G 的亲和性
人	IgG(正常)	++++	++++
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++

续表

抗体来源	IgG 类型	与蛋白 A 的亲和性	与蛋白 G 的亲和性
	IgG_3	−	++++
	IgG_4	++++	++++
小鼠(mouse)	IgG_1	+	++++
	IgG_{2a}	++++	++++
小鼠(mouse)	IgG_{2b}	+++	+++
	IgG_3	++	+++
大鼠(rat)	IgG_1	−	+
	IgG_{2a}	−	++++
	IgG_{2b}	−	++++
	IgG_{2c}	+	++
山羊(goat)	IgG	−	++
绵羊(sheep)	IgG	−/+	++
家兔	IgG	++++	+++
狗	IgG	++++	++++
猪	IgG	+++	+++
鸡	IgG	−	+
马	IgG	++	++++
豚鼠(guinea-pig)	IgG	++++	++
仓鼠(hamster)	IgG	+	++
猫	IgG	++++	−
小牛	IgG	++	++++

IgG 分子质量为 150 kDa 左右，由 4 个亚基组成，即两条重链(H)和两条轻链(L)。用水解酶(木瓜蛋白酶)水解后可得到两种片段，即 Fab 和 Fc。其中 Fab 是具有抗原识别活性的部分，回收后制备探针。Fc 能够与蛋白 A 和蛋白 G 特异性结合。但这种分离只能在有条件的实验室进行。

其基本过程如下：

(1) 用 PBS(pH 7.0，含 10 mmol/L EDTA，20 mmol/L 盐酸半胱氨酸)溶解纯化的 IgG。

(2) 加固化木瓜蛋白酶。

(3) 37℃处理 5h。

(4) 离心，去除固化木瓜蛋白酶(沉淀)。

(5) 过蛋白 G 柱。

(6) 纯化的 Fab 片段按前文方法做进一步处理。

注意：Fab 与胶体金结合的 pH 为 6.5。

4.2.2.4　蛋白与胶体金结合最佳 pH 测定

例：纤维素酶，pI 未知。

(1) 取若干个 1.5ml 试管,分别加入 1ml 10nm 胶体金。

(2) 用 25mmol/L K_2CO_3将 pH 分别调为 3、4、5、6、7、8、9、10。

(3) 取一 96 孔培养板,按 pH 从低到高分别将上述胶体金分别取 100μl 加入孔中,重复 3 次。

(4) 每孔分别加入 3μl 浓度为 1mg/ml 的纤维素酶,混合,室温下放置 10～15min。

(5) 每孔分别加入 20μl 浓度为 10% NaCl 溶液,混合,室温下放置 10min。

(6) 观察胶体金颜色变化,记录保持红色的最低 pH(X)。

(7) 重复步骤(1)～(5),pH 梯度为 X－0.6;X－0.3;X;X+0.3;X+0.6;X+1。

(8) 观察胶体金颜色变化直到室温下放置 2h,记录仍保持红色的最低 pH。

注意:①如胶体金粒子直径较小(3～6nm),加 NaCl 需放置较长时间(几个甚至十几个小时)后才能观察到颜色变化。必要时可放大反应体积(1ml 胶体金),并借助离心来判断。②有些蛋白最佳 pH 范围较窄,设置的梯度不能太大。

4.2.2.5 最小蛋白浓度的确定

(1) 用 0.22μm 微孔滤膜过滤或高速离心去除蛋白中残物或多聚体。

(2) 取一 96 孔滴定板,每个重复为若干个孔,分别加入最佳 pH 的胶体金 100μl,重复3 次。

(3) 各孔依次加入不同量的蛋白(一般浓度为 0.05～0.1mg/ml)1～20μl,混匀,室温下放置 15min。

(4) 加入 20μl 10% NaCl 溶液,室温下放置 10min。

(5) 颜色仍保持红色的最小蛋白用量即最小蛋白浓度。

(6) 为确保结果准确性,可放大反应体积重复以上步骤。

注意:在实际探针制备工作中,蛋白浓度往往为最小浓度的 130%。

4.2.2.6 IgG-胶体金的制备

(1) 取两个 1.5ml 试管,分别加入 1.2ml 10nm 胶体金。

(2) 加入适量 25mmol/L K_2CO_3把 pH 调整为 9.0。

(3) 分别加入 10μl 浓度为 1mg/ml IgG,混匀,室温放置 10min。

(4) 分别加入 12μl 2% PEG20 000,室温放置 5min。

(5) 10 000r/min 离心 20min,轻轻吸除上清液。

(6) 用 20μl BL 溶液重悬浮松散的胶体金沉淀,并集中到新管中。

(7) 分别加 20μl 甘油,充分混匀。

(8) －20℃保存备用。

注意:

(1) 不同直径胶体金所需要的蛋白量差别很大。

(2) 不同直径胶体金所需离心速度完全不同。以绝大部分探针形成松散沉淀为原则。离心力太大,会产生不可逆的探针凝聚;离心力太小,探针无法沉下。最好能够直接用胶体金在不同转速下离心以确定适当的离心力。

(3) 在冷离心机中可适当延长离心时间,同时适当减小离心力,探针活性较好。

(4) IgG 的最佳交联 pH 有多种报道,从 7.4～9.0。一般认为,7.4 时胶体金结合的蛋

白最多，pH9.0 时制备的探针最稳定。

4.2.3　样品的固定、包埋与标记

4.2.3.1　固定

为了减少对标记底物结构的破坏，细胞化学样品固定的时间相对较短，多为 1～3h。环境温度一般在 25℃以下。

低温固定剂一般采用 2%～3%甲醛与 1%戊二醛。甲醛分子量小、渗透快，对蛋白质结构影响小，可较好地保存其抗原活性。但对细胞整体的细微结构保存欠佳。戊二醛对细胞的细微结构保存较好，但往往导致蛋白失去抗原活性。因此，在标记底物不是蛋白质或多肽时（如纤维素、多酚类化合物、β-1,3-葡聚糖、几丁质等），可用常规方法进行 4%戊二醛和 1%锇酸的双固定。

4.2.3.2　包埋

根据标记底物的不同，可以选择常规（常温）包埋剂或低温包埋剂包埋样品。如果标记物为蛋白质，特别是性质不稳定或不清楚时，建议使用低温包埋剂包埋，以最大程度地保存抗原活性。大量实验表明，K4M 是目前使用最为普遍的低温包埋剂。当选择常温包埋剂时，建议使用 Spurr 包埋剂。Spurr 包埋剂黏性小，易渗透，易操作；包埋块不吸潮，保存时间长。

4.2.3.3　标记

根据标记程序的不同，标记分直接与间接标记（图 8-2）。直接标记指胶体金探针直接与被标记底物结合；而间接标记指胶体金探针通过一个或多个中间标记物后与底物结合。

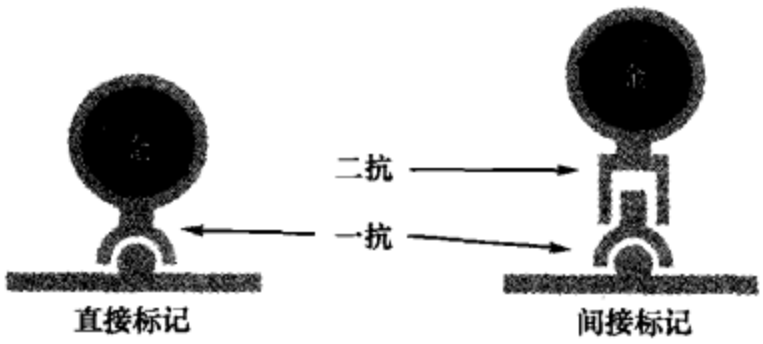


图 8-2　胶体金标记原理示意图

直接标记需要制备胶体金探针，其好处是标记特异性好，背景小，能够做阴性对照。间接标记无需制备胶体金探针，可以直接购买通用二抗探针，缺点是标记特异性较难把握，背景较高，不能够做阴性对照。

在做病毒粒子标记时，直接标记法可用抗体直接富集低浓度或稀有病毒而不会增加任何背景。

影响标记的因素主要包括以下几个方面（表 8-4）。

表 8-4　常见胶体金探针制备条件（10ml 直径 10nm 胶体金）

探针蛋白	来源	分子质量（kDa）	交联 pH	最佳标记 pH	蛋白用量（μg/ml）	重悬浮液	特异性标记底物
IgG	哺乳动物	150～160	7.0～9.0		120	BL	各种抗原
IgG Fab	IgG 水解	45	7.5		150	BL	各种抗原

续表

探针蛋白	来源	分子质量(kDa)	交联 pH	最佳标记 pH	蛋白用量(μg/ml)	重悬浮液	特异性标记底物
蛋白 A	葡萄球菌	42/32(recomb)	60	8.2	60	BL	多种抗体(Fc 片段)
蛋白 G	链霉菌	45～47	6.0		90	BL	多种抗体(Fc 片段)
麦胚凝集素(WGA)	大麦	36	7.2/9.5		125	BL	几丁质
伴刀豆凝集素(Con A)	伴刀豆	102	8.0		250	1 mmol/L Ca^{2+} + 1mmol/L Mn^{2+} in BL	α-甘露糖＞α-葡萄糖＞几丁质
蓖麻凝集素 I(RCA I)	蓖麻	120	8.0		60	BL	β-半乳糖＞α-半乳糖＞＞几丁质
大豆凝集素(SA)	大豆	110	7.4		65	BL	D-氨酰化半乳糖
花生凝集素(PA)	花生	110	6.3		130	BL	D-氨酰化半乳糖
亲和素(avidin)	鸡蛋	67	11.0		120	BL	生物素(biotin)
链亲和素(streptavidin)	链霉菌	60	7.5		200	BL	生物素
β-1，3-葡聚糖酶	烟草		5.5		180	BL	β-1,3-葡聚糖
纤维素酶	绿色木霉	9.0/7.5			160	BL	纤维素
漆酶(lacasase)	白色腐霉	4.0			100	BL(pH 6.0)	多酚类化合物

(1) pH：pH 变化会对探针蛋白的结构与活性中心产生影响，继而影响到标记强度与特异性。在很多情况下，探针作用的最佳 pH 往往与该蛋白作用的最佳 pH 有一定差别。例如有一种来自真菌的纤维素酶本来在 pH 4.8 时活性最强，但结合到胶体金上后，pH 在 6.0 左右时最强，当 pH7.2 时仍有较强的标记活性。

(2) 溶液离子环境：有些蛋白只有在一定离子环境中才有生物活性，其中很多涉及 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Cu^{2+} 等阳离子。有时溶液中 Ca^{2+}、Cu^{2+} 等容易形成不溶性沉淀而导致标记失败；因此，在配制标记溶液时要注意各种阴阳离子的配伍，添加顺序及溶液 pH。

(3) 温度：标记温度对标记活性及特异性影响最大，也最容易出问题。以水解酶类做成的胶体金探针对温度变化也更为敏感，不同温度、不同时间标记出的切片其视觉效果完全不一样。在此特别指出一点，在用内切水解酶探针时，切忌温度过低，时间过长，否则会出现标记的扩散现象。建议在可能时尽量使用外切酶探针。

在使用 IgG 或蛋白 A、蛋白 G 探针时，有人认为在 4℃下长时间标记特异性最好。但我们研究发现事实并非如此，在 25℃以上的室温下标记 20～60min 其特异性更好。

一般来说，如果用来自植物或微生物的蛋白做探针，标记温度最好在 25℃左右；用来自动物的蛋白做探针时，标记温度最好在 30℃左右。

(4) 封闭液组成:封闭液对封闭有关非特异性活性基团,特别是醛基至关重要。在多数情况下,封闭液与探针重悬浮液、标记溶液是一样的。目前,最常用的封闭液组分有 BSA、卵清蛋白、脱脂奶粉、PEG20000 等。在用 IgG、蛋白 A、蛋白 G 等标记时,应优先选用 BSA;在植物凝集素类探针标记时,应优先选用 PEG20000。也有人发现 IgG 探针标记时脱脂奶粉最佳。

如果是用交联蛋白做成的探针,那么封闭液中最好有载体蛋白的成分。

封闭液(blocking solution, BL)配方: 50 mmol/L PBS, pH 7.0,内含 1% BSA,0.02% PEG20000,10 mmol/L NaCl,1% NaN_3。0.22μm 过滤,分装为 1.5ml,冷冻保存。

4.2.3.4　样品的低温包埋的基本程序

(1) 将新鲜样品切成 1mm×1mm×3mm 的小块,立即放入 3%甲醛和 1%戊二醛的磷酸缓冲液(100mmol/L,pH 7.2)中 4℃下固定 2h。

(2) 在 4℃依次用 30%、50%乙醇溶液脱水,每步 30min。

(3) 在−20℃冰箱中依次用 50%、70%、90%、100%、100%、100%乙醇溶液脱水,每步 60min。(注意乙醇溶液首先在冰箱中预冷)

(4) 在−20℃冰箱中依次用 30%、70%、100%的 K4M 树脂渗透,每步 120min;注意不断轻轻摇动样品使渗透完全。

(5) 在 4℃ K4M 树脂包埋。注意包埋剂应尽量装满,否则气泡中的氧气会抑制包埋剂的聚合。

(6) 在−20℃冰箱中长紫外线照射聚合 72h。室温下聚合 48h。注意每天翻动 2 次样品使紫外光照射均匀。

(7) 聚合后的样品应及时切片,长时间放置会导致样品与包埋剂之间分离而无法切片。

(8) 超薄切片应收集在镍网、金网或铍网上做胶体金标记。

与其他标记用包埋剂相比,K4M 树脂可在−35℃低温下仍保持较低的黏度;K4M 树脂有极性,亲水,易脱水,易标记;聚合后交联度高,易切片。

K4M 树脂的配方根据材料的性质确定。植物或坚硬的材料包埋剂的硬度要高;动物或幼嫩材料包埋剂的硬度要低。具体参见包埋剂说明。

注意:

(1) K4M 树脂有毒,须带 PVC 或 PVDV 手套谨慎操作。溅入眼睛或皮肤时请立刻用清水冲洗。

(2) 所有脱水乙醇须提前预冷。

(3) 脱水过程中防止样品结霜吸潮。

4.2.4　样品常温包埋(常规)的基本程序

(1) 将新鲜样品切成 1mm×1mm×3mm 的小块,立即放入 4%戊二醛磷酸缓冲液(100mmol/L,pH7.2)中 4℃下固定 6～12h。

(2) 样品用磷酸缓冲液冲洗 3 次,每次 5min;然后在 2%锇酸溶液中固定 1h;冲洗 3 次,每次 5min。(通风橱中戴手套进行,含锇酸废液倒入食用油中!)

(3) 在 4℃或室温下依次用 30%、50%、70%、90%、100%、100%、100%乙醇溶液脱水,每步 15min。

(4) 依次用30%、70%、100%的Spurr包埋剂渗透,每步120min;然后在100%的Spurr包埋剂中过夜。

(5) Spurr包埋剂包埋。可包埋在0.5ml的离心管中,每管加0.3ml包埋剂即可。加入纸标签。

(6) 在70℃温箱中聚合12～16h。

(7) 聚合后的样品可长时间保存。超薄切片应收集在镍网、金网或铍网上做胶体金标记。

4.2.5 胶体金直接标记基本程序

(1) 在培养皿中铺上石蜡膜(parafilm);四周加吸水纸和水以保湿。

(2) 加一滴dd H_2O,镍网切片向下漂浮2min。

(3) 另滴50μl封闭液,将镍网切片向下漂浮30min。

(4) 另滴50μl封闭液,加入2～3μl胶体金探针,充分混匀;将镍网切片向下漂浮30min。

(5) 标记后镍网的在ddH_2O上漂洗除去未标记的胶体金探针,共漂洗3次,每次5～10min;晾干。

(6) 常规染色,观察。

4.2.6 胶体金间接标记基本程序

(1) 镍网切片向下在dd H_2O上漂浮2min。

(2) 在封闭液上漂浮30min。

(3) 把一抗用封闭液稀释100～500倍,将镍网切片向下漂浮30～60min。

(4) dd H_2O漂洗2次各5min,去除多余一抗。

(5) 在封闭液上漂浮30min。

(6) 用胶体金探针标记30min。

(7) dd H_2O上漂洗除去未标记的胶体金探针,共漂洗3次,每次5～10 min;晾干。

(8) 常规染色,观察。

4.2.7 用胶体金间接标记法进行双标记的基本程序

(1) 镍网切片向下在dd H_2O上漂浮2min。

(2) 在封闭液上漂浮30min。

(3) 把一抗A用BL稀释100～500倍,将镍网切片向下漂浮30～60min。

(4) dd H_2O漂洗2次各5min,去除多余一抗A。

(5) 在封闭液上漂浮30min。

(6) 用小颗粒胶体金探针A标记30min。

(7) dd H_2O漂洗2次各5min,去除多余胶体金探针A。

(8) 重复步骤(2)～(7),其中抗体和探针改用一抗B和大颗粒胶体金探针B。

(9) dd H_2O上漂洗除去未标记的胶体金探针,共漂洗3次,每次5～10min;晾干。

(10) 常规染色,观察。

4.2.8　用胶体金直接标记法进行双标记的基本程序

如果两种探针的重悬浮液相同(如同为 IgG-胶体金),可直接混合,按 4、2、5 中的胶体金直接标记方法进行。单混合时大颗粒胶体金的量要适当增加。

如果两种探针的重悬浮液差别较大,可分别进行直接标记。步骤如下:

(1) 镍网切片向下在 dd H_2O 上漂浮 2min。

(2) 在封闭液上漂浮 30min。

(3) 用胶体金探针 1 标记 30min。

(4) dd H_2O 上漂洗除去未标记的胶体金探针,共漂洗 2 次,每次 5～10min。

(5) 在封闭液上漂浮 30min。

(6) 用胶体金探针 2 标记 30min。

(7) dd H_2O 上漂洗除去未标记的胶体金探针,共漂洗 3 次,每次 5～10min;晾干。

(8) 常规染色,观察。

4.2.9　接法标记粗提纯病毒

(1) 取新覆膜镍网,在用封闭液稀释 500 倍的病毒抗血清上漂浮 3min。

(2) 在病毒溶液上吸附 10min。

(3) 封闭液封闭 30min。

(4) 一抗胶体金探针标记 30～120min。

(5) 水洗 3 次,每次 5～10min。

(6) 2%醋酸双氧铀象染。

注意:

(1) 如果使用间接标记方法,不能采用或只能采用高度稀释的抗体吸附病毒。否则,高强度的标记背景会影响正确判断。

(2) 该方法允许多探针直接混合一步法同时标记多种病毒。特别适用于对未知病毒的检测。

4.2.10　胶体金标记技术路线的选择

(1) 包埋剂:根据抗原或标记底物性质决定包埋剂种类。蛋白类,推荐使用 K4M;包埋后立即切片标记。外泌蛋白可选择 Spurr 树脂。可长期保存使用。细胞结构组分,如纤维素、β-1,3-葡聚糖、几丁质、多酚化合物等,可选择 Spurr 树脂。

(2) 胶体金体积:精细定位如病毒、细胞器定位等选用 5nm 胶体金。细胞壁组分采用 15～20nm 胶体金。多标记时,胶体金直径推荐选用 6nm、10nm、15nm;稳定抗原采用较大颗粒胶体金。一般蛋白标记采用 10nm。

(3) 通用探针选择

1) IgG-胶体金:－20℃可保存 1 年;但定位时胶体金距离标记位点较远,不适于精细定位。

2) 蛋白 A/G:－20℃可保存 3 个月;但定位时胶体金距离标记位点较近,适用于精细定位和多标记。

胶体金的颗粒及胶体金标记在真菌研究中的应用举例(图 8-3～图 8-10)。

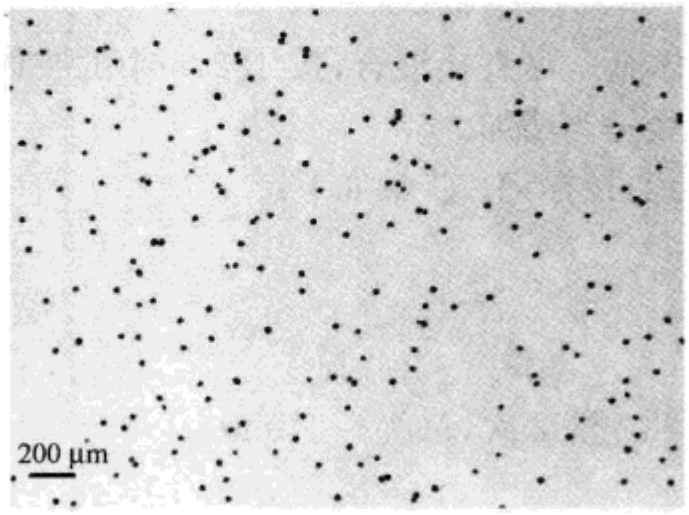


图 8-3　分散良好的胶体金颗粒

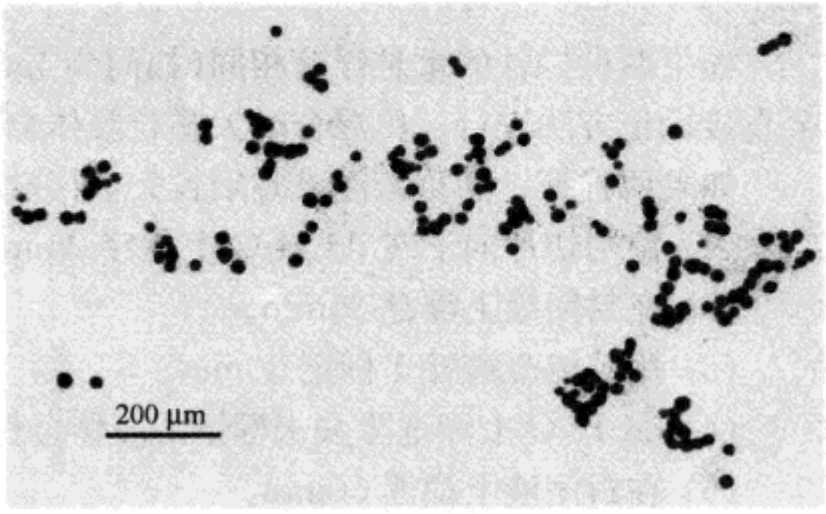


图 8-4　凝聚的胶体金颗粒

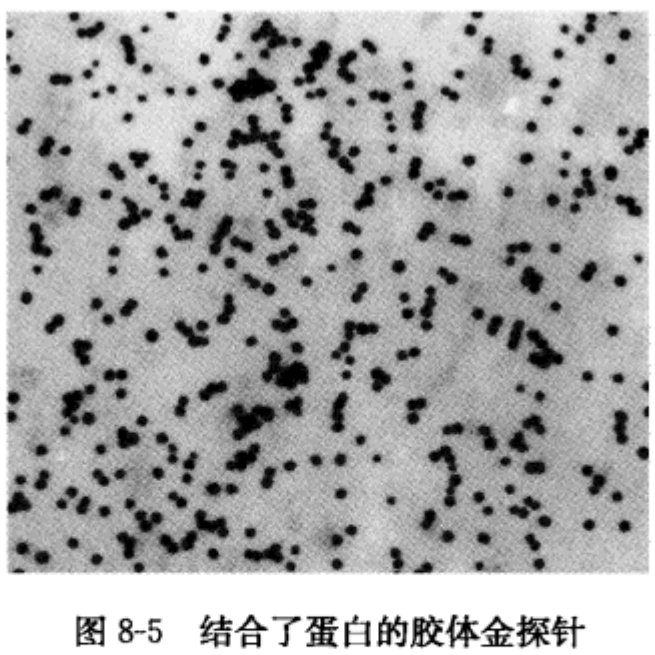


图 8-5　结合了蛋白的胶体金探针

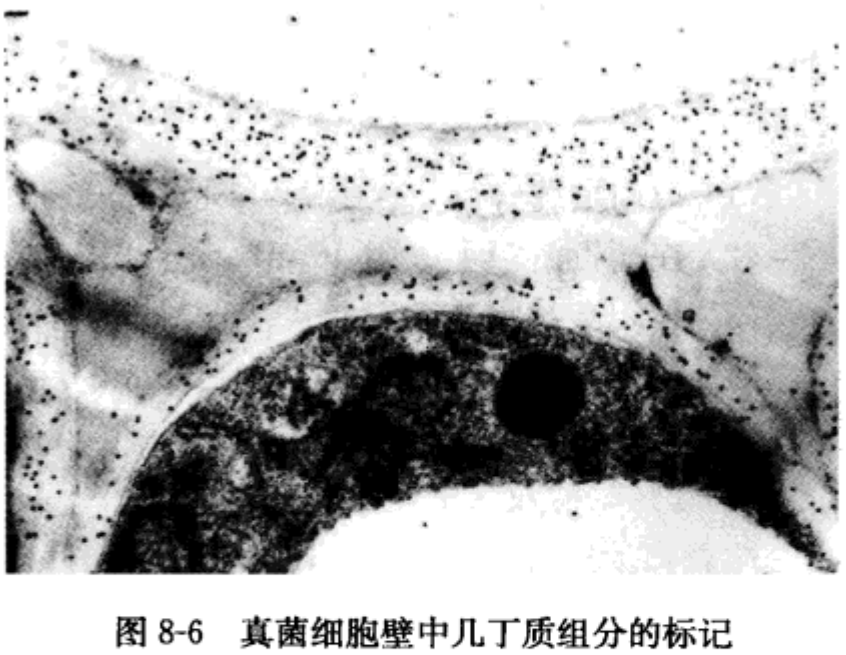


图 8-6　真菌细胞壁中几丁质组分的标记

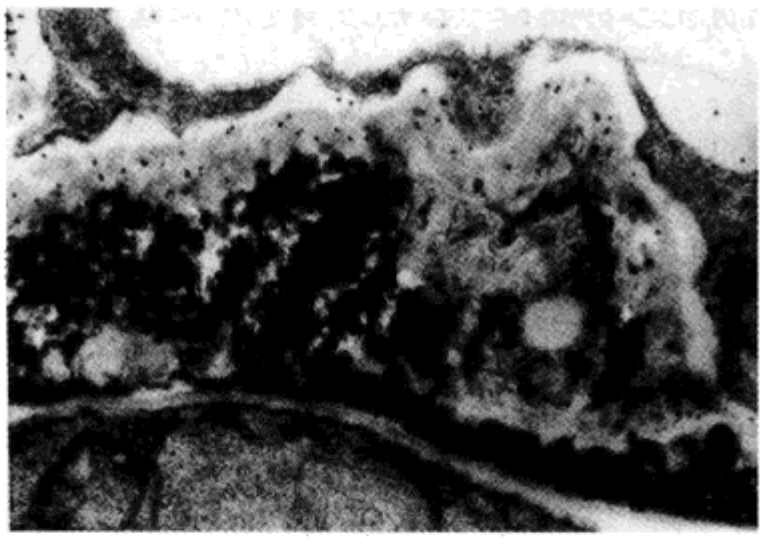


图 8-7　白粉病菌侵染导致植物防卫反应基因的免疫金标记

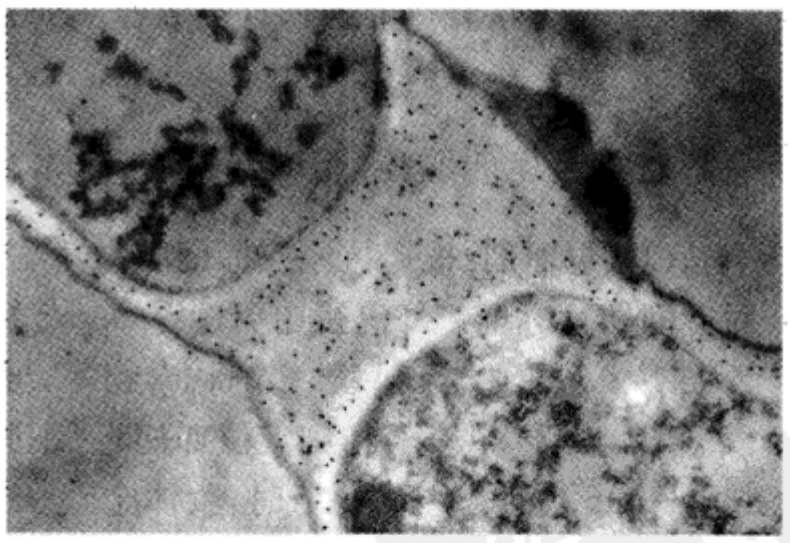


图 8-8　植物防卫反应基因表达的免疫金标记
其蛋白积累在病原菌吸器周围

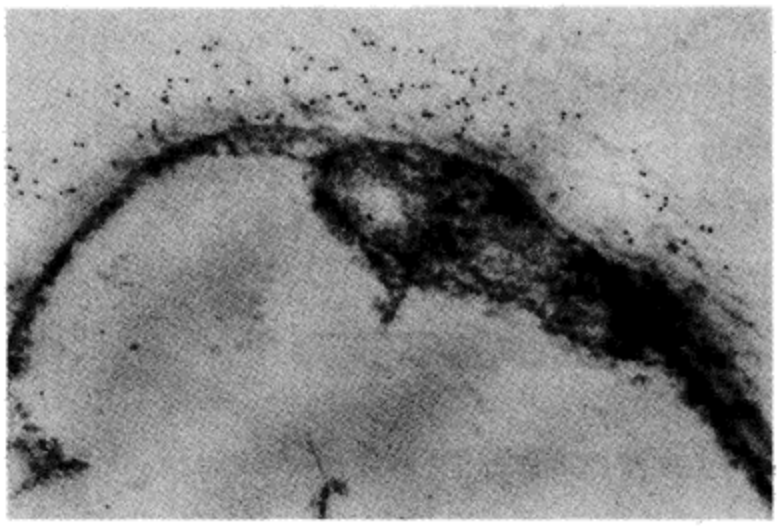


图 8-9　真菌外泌蛋白的免疫金标记

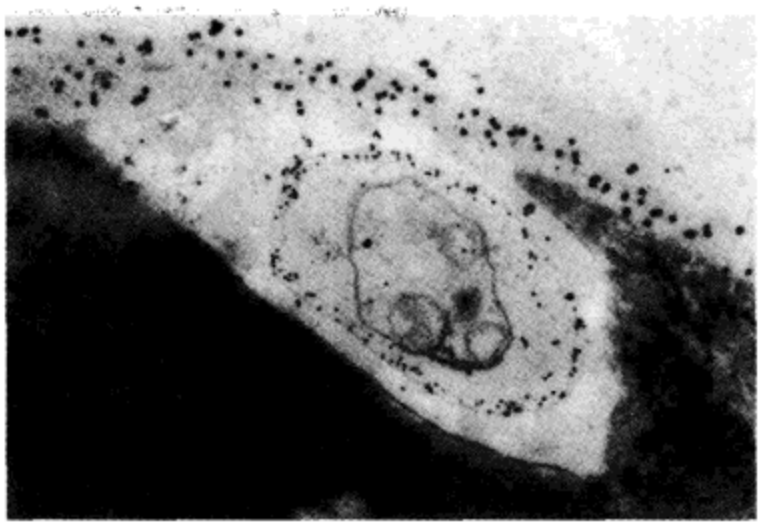


图 8-10　真菌细胞壁组分的胶体金标记
图中用 WGA 和 Cellulase 的胶体金探针分别标记两种不同真菌的细胞壁组分，发现木霉菌丝侵染进入疫霉菌丝细胞中

5　免疫组化技术

免疫组化(immuno-histochemistry)技术也是利用血清学原理，利用荧光类物质或酶促反应当作底物在光学显微镜下检测组织与细胞中的抗原类物质。该技术起始于 20 世纪 40 年代，后经过各种完善改良，目前被广泛应用于细胞生物学研究。特别是随着光学显微镜各种观察性能的改进、激光共聚焦显微镜的应用，免疫组化得到了进一步的普及应用并从定性进入与定量研究相结合的阶段。

5.1　基本原理

免疫组化技术的基本原理与免疫金技术非常相似，只不过是示踪物与检测仪器有所不同。即用荧光物质或利用酶反应的有色产物作为示踪物质，把荧光物质或酶预先与抗体结合在一起作为探针，用于探测细胞中抗原物质所在的位点，利用一般光学显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜进行检测，从而分析抗原物质在细胞中的合成、积累与分布情况。

如果把荧光物质与抗体结合(图 8-11A)，那么可以在荧光显微镜下进行观察，荧光物质在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜的激发光刺激下，可以发出荧光，从而显示抗原物质所处的位置与量的多少。如果把酶与抗体结合(图 8-11B)，那么在探针处理细胞后，需要添加酶反应当底物进行酶促反应，从而产生有色的产物，然后在显微镜下进行检测分析。

5.2　荧光素标记抗体与酶标记抗体

有的化合物能够在吸收了外来能量后，即刻散发出荧光，终止了能量供给，发光也马上停止。这些物质就是荧光素或荧光染料。在组织化学中，荧光素与抗体交联在一起作为标记探针使用。在光学显微镜下，常利用荧光素的发光来监测抗体存在的部位与浓度。目前可供选择的荧光素种类非常多，但实际上最常见的是异硫氰酸荧光黄(FITC)。观察荧光素

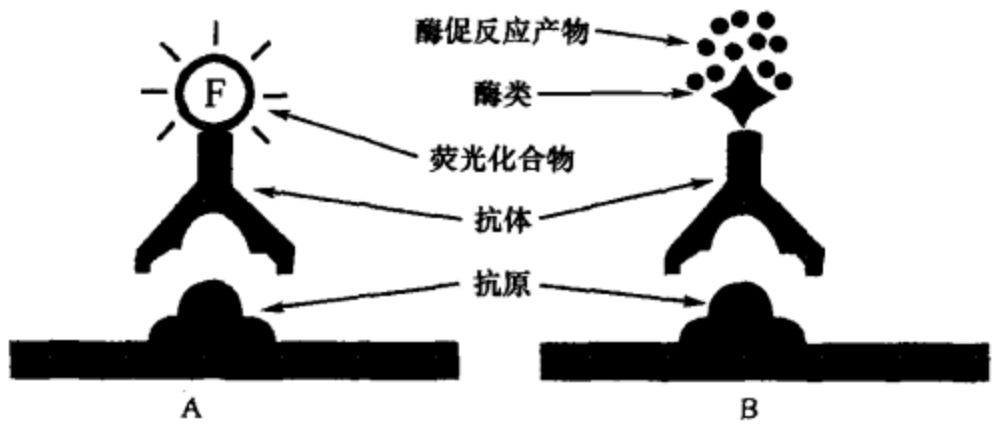


图 8-11 免疫荧光抗体标记(A)与免疫酶标抗体标记(B)原理

需要使用荧光显微镜,荧光素只有在受到激发光的激活后才能产生荧光。

除了荧光素外,免疫组织化学中另外还有一个常见的标记物酶标抗体。即把抗体和一种酶交联在一起,利用酶促反应产生显微镜下可见有色产物来监测抗体存在的部位。一般最常用的酶是过氧化物酶和碱性磷酸酶,它们都比较稳定。过氧化物酶可以使偶氮化合物如 DAB 发生聚合反应,生成分子量比较大的褐色或红褐色沉淀。碱性磷酸酶可水解底物 ATP,产生不溶性的深色磷酸盐沉淀。这些沉淀利用普通光学显微镜就可以清晰地分辨,从而确定抗原的分布位点。

5.3 标记方法

与电镜细胞化学方法的原理一样,免疫组化也分直接与间接的标记两种基本方法。直接标记法是把一抗直接交联到酶或荧光素上作为标记探针使用,它可以直接识别抗原;而间接法是把二抗交联到酶或荧光素上作为标记探针使用,用它来识别一抗,而不是直接去识别抗原。因此,免疫组化的实验步骤与电镜细胞化学极其相似。

5.3.1 直接法

用 1%BSA 的 PBS 缓冲液预处理标本片 30min;然后滴加稀释了 50～100 倍的酶标抗体或荧光抗体进行标记处理;PBS 缓冲液充分洗涤;如果使用酶标抗体,添加底物在适宜温度条件下进行酶促反应;充分洗涤,然后在荧光显微镜下观察。标本中如有相应抗原存在,那么就能够与酶标抗体或荧光抗体进行特异性结合,在镜下可检测到荧光或酶促反应的产物。该方法简单,特异性强,但其缺点是需要在实验室进行一抗与标记物的交联,技术要求高,费时费力。

5.3.2 间接法

用 1%BSA 的 PBS 缓冲液预处理标本片 30min;然后滴加适度稀释的抗体或抗血清(视抗体情况稀释 100～1 000 倍不等)进行处理;PBS 缓冲液充分洗涤;然后滴加酶标抗体或荧光抗体进行标记处理;PBS 缓冲液充分洗涤;添加底物在适宜温度条件下进行酶促反应;充分洗涤;然后在荧光显微镜下观察。该方法的优点是使用商品化的酶标抗体或荧光抗体,成功率高,简单方便。缺点是容易产生假阳性结果。

5.4　样品的处理方法

免疫组化的样品处理与一般光镜样品处理步骤相似，唯一要注意的是要尽可能地保护抗原的活性。

对于人工培养的真菌来说，可以直接挑取活的菌丝或孢子固定在载玻片上进行标记处理。对于寄生在植物或动物体上的真菌，一般均需要做切片处理。如果是一般的石蜡切片，最好采用低熔点石蜡，适当缩短处理周期。如果采用树脂切片，最好使用低温包埋剂，其处理方法与细胞化学方法相同。

第九章　丝状真菌的生化研究方法

1　概述

基因功能的鉴定和基因产物的特性是丝状真菌生化研究的重点。丝状真菌的蛋白研究使用与其他生物同样的方法。首先要进行菌丝培养，从菌丝中分离各种细胞器，然后再从中分离各种特殊的蛋白质。

2　抽提物的准备

2.1　菌丝的准备

为了获得可重复的实验结果，需要仔细控制培养物的生长条件和收集时间。方案 1 描述了进行蛋白抽提前的菌丝处理方法。

方案 1　菌丝的摇瓶培养

设备与试剂：

1. 振荡摇瓶，最好为长颈振荡摇瓶(baffled flask)。
2. 微孔布(Miracloth)或过滤纸巾。
3. 缓冲液 A：10mmol/L Tris-HCl，1mol/L 山梨醇，1mmol/L PMSF。

方法与步骤：

1. 使用合适的培养基，接种孢子至浓度为 2×10^6/ml。
2. 在合适的温度(如 25℃、30℃或 37℃ 250r/min)培养 16～20h。
3. 使用微孔布收集菌丝，用冷的 ddH_2O 洗涤。或使用多层过滤纸巾过滤收集菌丝，用冷的缓冲液 A 洗涤。
4. 用吸水纸吸干菌丝的水分，称重。一般每 400ml 培养基可获得 3～5g 菌丝。
5. 立即用液氮冷冻菌丝块。菌丝块可以保存在－80℃或者直接使用。

2.2　菌丝中样品的抽提

菌丝中生化样品的抽提可以从新鲜的、冰冻的或速冻保存的材料开始。方案 2 描述了疏水蛋白的抽提方法。

方案 2　疏水蛋白的分离

设备与试剂：

1. 研钵和研杵。
2. 离心机。

3. 缓冲液 A　50mmol/L 柠檬酸钠 pH 6.0,2%SDS,1mmol/L PMSF。

方法与步骤:

1. 在液氮中碾磨 1g 冷冻或冻干的菌丝。

2. 室温用 4ml 缓冲液 A 抽提 30min。

3. 10 000g 离心 10min 获得菌体沉淀。

4. 室温,用溶于 20% 乙氰(acetonitrile)的 0.1% 三氟乙酸(trifluoroacetic acid)抽提 5min 获得疏水蛋白。

3　细胞组分的准备

从整个菌丝体中抽提蛋白质通常不适用于研究细胞的代谢过程,尤其是那些在各种细胞器中进行运输的蛋白组分。在很多情况下,可以通过分离不同细胞器来定位蛋白质。

3.1　细胞质膜

通过分离细胞膜,可以获得没有细胞质内容物的细胞膜泡,并用于研究物质的运输过程。

方案 3　细胞膜的分离

设备与试剂:

1. 离心机。

2. 缓冲液　25mmol/L MOPS/KOH pH 7.2,0.25mol/L 蔗糖,5% 甘油(*W*/*V*),1mmol/L $MgCl_2$,2mmol/L DTT,1mmol/L EDTA,1mmol/L PMSF,0.15mmol/L 丁卡因(tetracaine),1μg/ml 抑胃肽(pepstatin),1μg/ml 亮肽素(leupeptin)。

3. 细胞匀浆用玻璃珠。

4. 二氧化硅密度离心胶(Percoll)。

5. 50% 密度梯度分离液(Nycodenz)。

方法与步骤:

1. 收集菌丝,用等体积的 0.9% NaCl 洗涤。

2. 在冷的(4℃)缓冲液中悬浮细胞(4mg/ml)。

3. 用 1mm 直径的玻璃珠匀浆　在盛有 50g 玻璃珠的 75ml 烧杯中加满细胞悬浮液,使用 Braun MSK 匀浆机全速匀浆 2min,使用液体 CO_2 挥发冷却。

4. 3 000g 水平离心 5min,去除细胞和残渣。

5. 上清液中加入 Percoll 到终浓度的 24%。

6. 45 000g 离心 30min。

7. 移出含有封闭细胞膜的上层条带(sealed plasma membrane),用缓冲液稀释 4 倍。

8. 100 000g 离心 2h,去除 Percoll。

9. 收集 Percoll 沉淀上方的细胞膜沉淀,用缓冲液悬浮,至总体积为匀浆液体积的 5%。

10. 混合 4.8ml 的细胞膜悬浮液和 3.2ml 的 50% Nycodenz(缓冲液稀释)。

11. 把上述混合物加入一个厚壁管子中,再在上面稀释加入 6ml 15% 用缓冲液稀释的

Nycodenz 和 4ml 缓冲液(总体积为 18ml)。

12. 90 000g 水平离心 90min。

13. 重新收集位于 15% Nycodenz 和缓冲液界面的白色带层,用缓冲液稀释 10 倍。

14. 稀释液 25 000g 离心 30min。

15. 用少量的缓冲液悬浮沉淀,液氮保存。

3.2 细胞器

许多蛋白质分布于特定的细胞器,从这些细胞器分离纯化蛋白质可以确定蛋白质的位置,至少可以防止蛋白的降解。

3.2.1 液泡

真菌液泡类似于植物的液泡或哺乳动物的溶酶体,含有蛋白酶和核酸酶。分离液泡时使用 1M 的山梨醇作为渗透压调节剂,可以减小液泡体积,缓解液泡在提取过程受到的机械和渗透压变化的伤害。

方案 4 脉孢霉的液泡分离

设备与试剂:

1. 珠磨式组织研磨器(Bead beater,Biospec,日本)。

2. 特氟纶玻璃匀浆机(Teflon glass homogenizer)。

3. 水平超速离心机。

4. 缓冲液 A 10mmol/L MES/Tris,1mol/L 山梨醇,2mmol/L $MgCl_2$,1mmol/L 菲咯啉(*o*-phenanth- roline),2 mmol/L ATP,1 mmol/L PMSF pH 6.9。

方法与步骤:

1. 340ml 容器中先加入一半容量的 0.3～0.5mm 直径的用缓冲液浸湿的玻璃珠,再加入足量缓冲液中的菌丝(10～20g)。

2. 匀浆 4 次,每次匀浆 30s,静止 1min。

3. 倒出容器中的匀浆物,用缓冲液 A 洗涤玻璃珠一次。

4. 混合匀浆物和洗涤缓冲液,4 000g 离心 10min,丢弃沉淀。

5. 上清液于 10 000g 离心 20min。

6. 用缓冲液 A 悬浮沉淀,特氟纶玻璃匀浆机转 2～3 冲程。

7. 在 18ml 的梯度山梨醇溶液(1.0～1.8mol/L,溶于缓冲液 A)上面铺放上述悬浮液。

8. 100 000g 水平离心 45min。如果没有超速离心机,在 18ml 离心管中,把样品放在 4ml 1.8mol/L 蔗糖溶液上面。在高速离心机中 43 000g 离心 2h 后也能产生一个连续的从 1.8mol/L 蔗糖到 1.0mol/L 山梨醇的 4ml 的梯度溶液。

9. 收集沉淀,悬浮于缓冲液 A,－80℃保存。

3.2.2 线粒体

一些代谢途径定位于线粒体,可以通过 GFP 定位来确定蛋白在线粒体内的分布。

方案 5　线粒体的分离

设备与试剂：

1. 缓冲液 A　10mmol/L TES-NaOH pH 7.5，1mmol/L EDTA。

2. 溶于缓冲液 A 的 1.2mol/L 蔗糖。

3. 溶于 ddH_2O 的 1.2mol/L 蔗糖。

方法与步骤：

1. 按照方案 4 的第 1～第 4 步，获得 10 000g 的离心沉淀。

2. 悬浮于缓冲液 A。

3. 把 10ml 的悬浮液铺放在梯度液的上面。

10ml 1.2mol/L 蔗糖。

10ml 1.2mol/L 溶于缓冲液 A 的蔗糖。

4. 43 000g 离心 2h。

5. 液泡将形成沉淀，而线粒体位于液面交界中；用巴斯德吸管(Pasteur pipette)吸出线粒体。

6. 稀释于等量的缓冲液 A。

7. 19 000g 离心 20min。

3.2.3　细胞核

细胞核内含有 DNA 结合蛋白，如组蛋白、转录因子、非组蛋白和 DNA 依赖性 RNA 合成酶等。

方案 6　细胞核的分离

设备与试剂：

1. 珠磨式组织研磨器(Bead beater，Biospec，日本)或研钵和研杆。

2. 离心机和超速离心机。

3. 缓冲液 A　50mmol/L Tris-HCl pH 7.5，5mmol/L $MgOAc_2$，20%甘油，5mmol/L EGTA，3mmol/L $CaCl_2$，1mol/L 山梨醇，7% Ficoll(聚蔗糖)。高压灭菌，保存于 4℃。使用前添加 1mol/L DTT 到 5mmol/L 和 0.01 体积的 100×蛋白酶抑制剂 A、B 和 C。临时储存在冰上，使用后丢弃多余部分。

4. 缓冲液 B　25mmol/L Tris-HCl pH 7.5，5mmol/L $MgOAc_2$，10%甘油，5 mmol/L EGTA。高压灭菌，保存于 4℃。使用前添加 1mol/L DTT 到 5mmol/L 和 0.01 体积的 100×蛋白酶抑制剂 C。临时储存在冰上，使用后丢弃多余部分。

5. 缓冲液 C　25mmol/L Tris-HCl pH7.5，5mmol/L $MgOAc_2$，10%甘油，1 mol/L 蔗糖。高压灭菌，保存于 4℃。使用前添加 1mol/L DTT 到 5 mmol/L。临时储存在冰上，使用后丢弃多余部分。

6. 缓冲液 D　25mmol/L Tris-HCl pH 7.5，5mmol/L $MgOAc_2$，25%甘油，0.1mmol/L Na_2EDTA。高压灭菌，保存于 4℃。使用前添加 1mol/L DTT 到 5 mmol/L。临时储存在冰上，使用后丢弃多余部分。

7. 100×蛋白酶抑制剂 A　200μg/ml 抑肽酶(aprotinin)，50μg/ml 亮肽素(leupeptin)，250μg/ml 抗痛素(antipain)，溶于水，−20℃保存。上述蛋白酶抑制剂在室温下约稳定 12h。

8. 100×蛋白酶抑制剂 B　100μg/ml 抑胃肽(pepstatin),溶于甲醇,−20℃保存。上述蛋白酶抑制剂在室温下约稳定 6h。

9. 100×蛋白酶抑制剂 C　100mmol/L PMSF,溶于无水乙醇,−20℃保存。PMSF 在水相中不稳定,使用时添加。

方法与步骤:

1. 珠磨式组织研磨器方法

(1) 粉碎冰冻的菌丝块和 20ml 缓冲液 A 一起放入珠磨式组织研磨器。

(2) 用 30s 高速研磨,然后停止 60s,反复 6 个重复周期,破碎菌丝。

(3) 把粉碎物倒入烧杯,用磁力搅拌器轻轻搅拌。

(4) 缓慢地加入缓冲液 B。

2. 研钵和研杵方法

(1) 在研钵中加入液氮和菌丝,研磨至很细的粉状,约 5min。

(2) 菌丝粉末加入在冰上预冷的烧杯,立即加入 20ml 的缓冲液 A。样品结冰后,需要约 10min 化冻。

(3) 一旦化冻,立即在冰上用磁力搅拌器搅拌。一旦匀浆均质化,缓慢加入 40ml 缓冲液 B。

3. 接上述步骤 1 或 2

(1) 2℃,转移到 30ml 的 Corex 管中,1 500g 水平离心 7min。

(2) 移去上清液,轻轻加入一层 5ml 缓冲液 C。

(3) 2℃,30 000g 水平离心 25min,使细胞核沉淀。

(4) 抛弃上清液,适当重悬沉淀。如果细胞核悬浮在缓冲液 D 中,保存在−80℃。如果继续抽提,则继续方案 7。

方案 7　细胞核的抽提

设备与试剂:

1. 缓冲液 E　15mmol/L HEPES-KOH pH 7.6,500mmol/L NaCl,5mmol/L $MgCl_2$,1mmol/L Na_2EDTA,5%甘油。添加 0.01 体积的 100×蛋白酶抑制剂 B 和 C。

2. 5×缓冲液 F　125mmol/L HEPES-KOH pH 7.6,200mmol/L KCl,5 mmol/L Na_2EDTA,50%甘油。高压灭菌,保存于 4℃。使用前配制成 1×BIND 缓冲液,添加 1mol/L DTT 到终浓度为 5mmol/L 和 100×蛋白酶抑制剂 C 到终体积的 0.1×。临时储存在冰上,使用后丢弃多余部分。

3. 透析管和超滤装置。

4. 超速离心机。

方法与步骤:

1. 在 4ml 缓冲液 E 中用微型吸管反复冲洗重悬细胞核粗提物。

2. 在冰上预冷 30min,轻轻搅动。

3. 4℃,100 000r/min 离心 30min。

4. 4℃在 1L 2×缓冲液 F 中透析上清液 4h。

5. 使用真空透析或通过离心超滤浓缩器(Centriprep 10unit)过滤浓缩样品到 0.5～1ml。

6. 测定样品的蛋白质浓度。以每份 50～100μl 分装，保存于－80℃。

3.2.4　微体

微体包括过氧化物酶体、乙醛酸循环体和糖酶体。

方案 8　微体的分离

设备与试剂：

1. 离心机。
2. 匀浆器(Potter homogenizer)。
3. 缓冲液 A　2g/L 柠檬酸 pH 6.4，60g/L KCl。
4. 缓冲液 B　0.1mol/L MES pH 7.5，60g/L KCl。
5. 缓冲液 C　0.1mol/L MES pH 7.5，5mmol/L DTT，1 mmol/L EDTA，25g/L NaCl。
6. Novozyme 234(Novo Biolabs，丹麦)。

方法与步骤：

1. 接种 48～72h 后收集菌丝体，用 0.9% NaCl 洗涤 1 次。
2. 用 100ml 缓冲液 A 重悬 20g 湿菌丝。
3. 加入 100mg Novozyme 234。
4. 100r/min 摇动 4h，25℃，产生原生质体。
5. 用缓冲液 B 洗原生质体 3 次。
6. 用缓冲液 C 重悬原生质体。
7. 用匀浆器研磨 5 次，进一步裂解细胞。
8. 1 000g 离心 15min，4℃，丢弃沉淀。
9. 上清液在 4℃，14 000g 离心 30min。沉淀包含有线粒体、液泡、内质网和微体。上清液在 4℃通过 100 000g 离心 1h，可以进一步分离获得可溶性蛋白质(上清液部分)和较小的细胞器和细胞膜泡(沉淀)。

4　蛋白分析

(1) 蛋白分析：常用 2D 电泳检测总蛋白。
(2) 特殊蛋白的检测：可以使用 Western 杂交检测特殊的蛋白质成分。

方案 9　孢子和菌丝的小量的蛋白质抽提

设备与试剂：

1. 离心机。
2. 冷水浴(cooling bath)。
3. 磁力搅拌器。
4. 真空泵。
5. 研钵和研杵。
6. 丙酮(－60℃)，冰，乙醇。
7. 缓冲液　50 mmol/L BES pH 7.3，用 KOH 调节。

方法与步骤：

方法一：

1. 把 50mg 干孢子放入聚苯烯离心管，冷却到－60℃。
2. 加入 10ml 丙酮，在－60℃搅拌 5min。
3. 13 000g 离心 5min，－15℃。
4. 把离心管放在冰-乙醇水浴中，用吸管移去丙酮。
5. 把离心管快速放在真空仪中，去除过量的丙酮。
6. 用 5ml 缓冲液加入干的粉末中，0℃搅拌 30min。

方法二：

1. 用 2g 的酸洗沙(acid washed sand)和 5ml 的缓冲液(20mmol/L 磷酸钾 pH 7.2)研磨 1g 菌丝，数分钟。
2. 把悬浮液转移到－60℃聚苯烯离心管。
3. 用 40ml 丙酮抽提，在－60℃搅拌 5min。
4. 13 000g 离心 5min，－15℃。
5. 把离心管快速放在真空仪中，去除过量的丙酮。
6. 用 20ml 缓冲液加入干的粉末中，0℃搅拌 30min。

方案 10　从固体培养物中分离胞外酶(*N. crassa* 的脂肪酶)

设备与试剂：

1. 离心机。
2. 冷冻干燥仪。
3. 0.9% NaCl。
4. 活性炭(activated charcoal)。
5. 缓冲液　50mmol/L 磷酸钾 pH 7.0，1 mmol/LDTE，1mmol/L PMSF。

方法与步骤：

1. 从固体培养物中收集孢子，悬浮于 0.9% NaCl，过滤，保存在 0.9% NaCl(0℃)中 30min。
2. 悬浮液于 20 000g 离心 15min，获得橙色的上清液。
3. 用 50mg/ml 的活性炭处理 30min，4℃，去除色素。
4. 20 000g 离心 10min。
5. 在 0℃冻干无色上清液。
6. 若要准备蛋白质，将冻干的样品用合适的缓冲液溶解后透析。

方案 11　从新鲜菌丝分离细胞内蛋白，适用于蛋白水解敏感蛋白的方法

设备与试剂：

1. 摇床(incubator shaker)。
2. 真空过滤器。
3. 搅拌机(blender)。
4. 超声波仪(sonicator)。
5. 离心机(centrifuge)。

6. 冻干机(freeze-dry equipment)。

7. 纸巾(paper towels)。

8. 抽提缓冲液　220mmol/L Tris-HCl pH 8(20℃)，11% 甘油，22% DMSO，11mmol/L$(NH_4)_2SO_4$，5.5mmol/L $MgCl_2$，0.55mmol/L EDTA，4.4mmol/L PMSF，每10g湿菌丝添加30μg抑胃肽A(pepstatin A，以1mg/ml浓度溶于甲醇)。

9. 5% polymin P。

10. 400mmol/L$(NH_4)_2SO_4$，溶于10%甘油。

方法与步骤：

1. 过滤收集菌丝，轻轻抽吸防止干燥。

2. 34℃，用生长培养基漂洗。

3. 转移到装有1/2体积的含有5mmol/L PMSF的生长培养基的容器中。

4. 34℃充气培养20min。

5. 过滤，用冰冷的水冲洗，强力抽滤，使冷却到0℃。

6. 用1倍或2倍的湿菌丝体积的抽提缓冲液，冷却菌丝到−15℃。

7. 用纸巾吸干菌丝，沉重。

8. 立即转移到−15℃的10倍湿重的抽提液中。

9. 用搅拌器最高速匀浆硬的菌丝块1～2min。

10. 超声处理，同时搅拌(黏度很高)和冷却。例如，400ml组分需在100W、20kHz，处理4～8次，每次1min。

11. 10 000g离心15min，−15℃，去除菌丝碎片。

12. 调节上清液的温度为0℃，加入0.075体积的5% polymin P溶液，搅拌5min。操作过程需在0～4℃下进行。

13. 10 000g离心20min，收集沉淀。

14. 用溶于10%甘油的400mmol/L$(NH_4)_2SO_4$溶液悬浮沉淀，轻轻搅拌，避免起泡沫。

15. 16 000g离心30min，收集上清液。

16. 每100ml上清液加入35g$(NH_4)_2SO_4$，允许有沉淀出现，放置1h或过夜。

17. 16 000g离心1h，收集沉淀。

18. 冷冻保存于−80℃，供进一步色谱分析。

方案12　从新鲜菌丝分离细胞内蛋白

设备与试剂：

1. French Press cell(高压细胞破碎仪)。

2. 离心机。

3. 缓冲液C　0.2 mol/L Tris-HCl pH 8.0，40%甘油，10mmol/L DTE，0.3mol/L NaCl。

方法与步骤：

1. 悬浮50g菌丝到150ml缓冲液中。

2. 10 000psi通过高压细胞破碎仪。

3. 用Sorvall SS34转头或类似转头15 000r/min离心30min。

4. 通过 polymin 沉淀和硫酸铵分级上清液。

方案 13　从冻干菌丝分离胞内蛋白

设备与试剂：

1. 研钵和研杵或搅拌机(blender)和过滤粗棉布。

2. 离心机。

3. Polymin。

4. 缓冲液 A　50mmol/L 磷酸钾 pH7.0，1mmol/L PMSF。

5. 缓冲液 B　20mmol/LTris-HCl pH 7.5，5mmol/L $MgCl_2$，3mmol/L EGTA，10mmol/L 苯甲脒，0.25μg/ml 抑胃肽，0.2μmol/L 抑肽酶，0.5μg/ml 亮肽素，每克菌丝加 10mmol/L 的巯基乙醇(2-mercaptoethanol)。

6. 硫酸铵。

方法与步骤：

方法一：

1. 室温用 2% PMSF 研磨干菌丝 5～10min。

2. 在 20 份体积的冰冷的缓冲液中搅拌获得的细粉状菌丝物质。

3. 10 000g 离心 15min。

4. 上清液通过 polymin 沉淀和硫酸铵盐析。

方法二：

1. 以 1∶15 的比例混合菌丝和缓冲液 B。

2. 用韦氏搅切机(Waring blender)粉碎菌丝。

3. 过滤粗棉布过滤。

4. 30 000g 离心 30min。

5. 上清液过柱状色谱，如离子交换树脂。

方案 14　酶学分析的代谢物抽提

设备与试剂：

1. 抽提缓冲液　50mmol/L Hepes pH 7.6 用 KOH 调节，0.2mmol/L EDTA，10mmol/L $(NH_4)_2SO_4$，50mmol/L 巯基乙醇，2%抗坏血酸钠。

2. 超声波仪(sonicator)。

3. 离心机。

方法与步骤：

1. 把 5mg 的干菌丝或孢子放入 1.5ml 的离心管。

2. 加入 0.5ml 抽提缓冲液。

3. 煮沸 5min。

4. 冰上冷却。

5. 超声破碎。

6. 离心。

7. 相应地稀释上清液。

第十章　真菌研究中的免疫学方法

1　概述

真菌免疫学研究始于20世纪60年代，从Flor、DeVay和其他研究者开始使用兔多克隆抗血清(pABs)研究了植物病原真菌与寄主在寄生关系建立早期的互相关系开始，到目前已经积累了大量资料。而杂交瘤技术及单克隆抗体的制备技术出现之后，为免疫学方法提供了现代真菌生物学家研究所需的特异性及重复性。有别于病毒之类的有机体，真菌细胞壁及细胞外的糖蛋白的复杂性及植物生长繁殖的土壤的复杂性表明，应用pAbs的传统手段在真菌生物学的研究中越来越局限。杂种瘤技术和单克隆抗体技术(mAbs)克服了很多问题并形成了真菌的免疫学，通过对自然感染植物和受侵染的土壤样品检测、量化和可视化分析，可进行纯培养的形态学、生物化学及生理学的详细研究。

制备pAbs和mAbs需要畜舍，因此对于没有畜舍的实验室，这可能是制备抗体的一个限制条件。而人类单克隆抗体的制备是通过噬菌体展示技术，这种技术具备应用于真菌免疫研究的巨大潜能，而目前得到抗体基因文库的途径有限，这意味着在不久的将来，源于免疫动物的免疫球蛋白是真菌生物学家获得抗体的唯一途径。

本章的目的是为真菌生物学家提供更多的基本方法论获得抗体的途径。重点放在杂交瘤的常规培养和维持，而不是详细的免疫和融合方法。同时，也提供了大量的常规免疫分析的标准方法以拓宽真菌研究的适用性。因此，本章将受到那些没有常规的畜舍设备、但在研究中的需要的pAbs或mAbs可以由商业机构提供的读者的首肯。

2　免疫原分子的特性

多克隆或单克隆抗体制备的第一步是宿主动物对合适抗原的免疫反应。一个好的免疫原能引起较强的初级和次级免疫应答的先决条件是：

(1) 必须有一个能被定位在B细胞表面的抗体识别的抗原决定基。

(2) 必须能被降解。

(3) 必须含有至少一个能同时被classⅡ蛋白识别的位点。

ClassⅡ蛋白是一种受体，当免疫原被部分降解成蛋白片段时，ClassⅡ蛋白可以与其中的一些片段结合。抗原片段与ClassⅡ蛋白的复合体与T细胞受体结合是B细胞分化成浆细胞的至关重要的一步。抗原决定基和classⅡ-T细胞受体结合位点的必要性意味着小于3 000～5 000Da的分子不是好的免疫原。这样大小的分子能结合到B细胞表面的抗体上，但并不能提供classⅡ蛋白和T细胞受体同时结合的稳定的结合位点。像合成肽或毒枝菌素这样的小分子到大的像牛血清蛋白或keyhole limpet haemocyanin(KLH)这样的分子都可以两两结合，克服了由于分子没有classⅡ-T细胞受体结合位点的缺陷，提供稳定的结合位点而诱导了对这些小分子的抗体反应。

2.1 免疫真菌材料的选择

目前已有多种方法用于真菌 pABs 和 mABs 的制备，但是这些方法中没有一种能提供制备属、种或菌株特异性的抗体的明确程序。然而，特异性的倾向已经出现。例如：当 pAbs 加到菌丝片断、冻干菌丝提取物、固体培养表面洗涤物或培养过滤物时，通常与相关或不相关的真菌和寄主植物组织提取物发生交叉反应。发生这种情况的原因是，不像病毒有典型包装蛋白，真菌细胞壁更为复杂，更重要的是细胞壁外含有糖蛋白。糖蛋白比简单的化合物具有更强的免疫原性。这些在免疫原上的重复糖类抗原决定基更容易与 B 细胞结合。然而，很多真菌糖蛋白的抗原决定基具有很强的保守性，可能属于同一属甚至相近属的真菌都产生相似的 pAbs，使产生的抗体不具有种属特异性。实际上，目前还没有发现具有真菌种间特异性的多克隆抗体，甚至 pAb 可以与不相关属或植物提取物发生交叉免疫反应。但最近的 DNA 重组技术的发展可能提供一种提高 pAb 特异性的方法，而不是采用能降低抗体的滴度的交叉吸收法或其他更不方便的方法。

不像 pAbs、mAbs 具有更高的特异性，可识别单一的属、种甚至真菌的菌株。然而，这也会随着真菌的变化而变化。mAbs 对单个真菌特异性的明显提高已被应用到共免疫技术当中，但仍需进一步地研究证实。同时，免疫试验前精心的考虑和计划仍是制备特异抗体和发挥其有效性的最成功的策略。要精心考虑抗体的最终用途，同样的问题，真菌的生物学也会对产生抗体产物的最合适的免疫原产生深远的影响。重点考虑的方面可能是：

(1) 应用抗体基质的复杂性。抗体是用于死亡组织、植物细胞中还是在土壤或混合肥料中的研究？

(2) 目标抗原是在自然环境中表达，还是其表达要受到诱导因子的控制还是不受影响？

(3) 目标抗原的稳定性及其制取的难易。

(4) 抗原的分布。它是在胞内还是胞外？它是发现自孢子、菌丝还是两者都有？从哪里分泌的？是在正在生长的菌丝的顶端还是沿着幼嫩和成熟的菌丝？是不是需要特殊的时期？需不需要区分菌丝及其他分化的细胞(附着胞、孢子、子实体)？

(5) 抗体是用来检测，量化或可视化？

(6) 抗原是只有目标物种产生，还是有大量相关及不相关的真菌产生？需不需要区分属和种？

2.2 免疫原的准备

除了一小部分研究外，大部分真菌的抗体都是通过用“黑匣子”的途径获得的。简单的冻干菌丝的盐溶液提取物、固体斜面培养基的表面冲洗物或者整个细胞器官被注射到动物中。

由于高浓度的具有免疫原性的多糖及糖蛋白的存在，这些不同种类的真菌抗原会在短时间内引起较强的免疫反应。此条途径的最大缺点是不同抗原引起免疫性会发生变化，这也导致一些分子在免疫反应中占主导地位。因此，虽然此条途径对制备抗体效率极高，但并不意味着能产生特异的多克隆抗血清。因此，制备纯的抗原会提高获得相对特异的 pAbs 的机会。然而，并不是所有纯的抗原都能引起好的免疫应答反应，且检测抗原具有免疫原性，更不用说用注射抗原并通过血液检测抗体产物等明显的经验检测方法了。另外，

通过这种方法制得的抗原已经变性，因此，产生的抗体可能不能结合到天然的抗原上。

对不同真菌抗原制备物产生免疫反应的强度和速度以及为杂肿瘤筛选而制造大量的抗原提取物的能力使得它们最有可能用来制备单克隆抗体。然而在杂交瘤细胞筛选的初期，种特异性的 mAbs 的鉴定和复原仍只能通过高效严格的筛选程序才能获得。

由于显微镜下可见，像分生孢子、厚垣孢子、芽管、吸器或附着胞等真菌器官作为抗原更切实一些。这些微粒抗原比可溶性的分子具有更强的免疫原性，孢子表面的抗原决定簇也可能在芽管表面存在，相同的抗原决定基在其他种或属的相似结构上也可能是保守的。方案 1 介绍了一些丝状真菌可溶性抗原的制备方法。制备整个器官用作免疫要更复杂，而且很大程度上决定于真菌。分离象 *Erysiphe* 和 *Colletotrichum* 兼性寄生活体营养菌专门器官(附着胞、侵染泡、胞内菌丝、吸器)的方法将在别处讲述。同时也讲述了 *Phytophthora* 和 *Pythium* 的游动孢子和 *Plasmodiophora brassicae* 休眠孢子的制备方法。

方案 1　免疫抗原的准备

设备与试剂：

1. 磷酸盐缓冲液(PBS)　80g NaCl，2g KCl，11.5g NaH_2PO_4，2g KH_2PO_4，定容至 1L。此缓冲液 pH 为 7.2，为 10×，用前稀释。

2. 1ml 移液枪及枪头。

3. 接种环。

4. 玻璃棉。

5. 离心管。

方法与步骤：

1. 菌丝表面的冲洗

(1) 在合适硬度的琼脂斜面培养基上接种真菌并生长。

(2) 在生长旺盛的幼嫩菌丝上滴加 2ml PBS，用 1ml 枪头轻轻敲打培养菌的表面。

(3) 转移含有溶解抗原的悬浊液至离心管，1 200g 离心 10min 以去除细胞残片。

(4) 转移提取液至一新的离心管，如果需要可加入佐剂(见本章 3.2 和 4.2 的内容)。

2. 菌丝及培养滤出液的冻干

(1) 接种真菌于合适的液体培养基中培养以获得菌丝培养物。

(2) 玻璃棉过滤，将菌丝及培养滤出液放入液氮中迅速冻干。

(3) 若长时间保存可用塑料瓶封好冻存。

(4) 免疫前，重新用 PBS 混合，1mg 固体/ml PBS(兔)或 10mg 固体/ml PBS(老鼠)，必要时可加佐剂。

3. 丙酮沉淀

(1) 用前述方法准备冻干菌丝的表面洗涤物及提取物，与丙酮混合使丙酮的浓度达到 70%(*V*/*V*)。

(2) 4℃温浴过夜，2 000g 离心 5min，去上清液，用无菌水重悬白色沉淀、冻干。

(3) 置于塑料管密封后可于冰箱中长期保存。

(4) 准备 0.5mg/ml PBS 做老鼠免疫，如需要可加佐剂。

4. 用 SDS-PAGE 纯化抗原或经电泳转至膜上

(1) 用聚丙烯酰胺凝胶分离样品,通过染色确定并割取相应条带。避免过度染色而导致蛋白质在胶中的过分固定。

(2) 割取相应凝胶条带并用去离子水冲洗胶块数次。

(3) 对于家兔,凝胶块可通过注射器针头用少量的 PBS 穿插数次而与蛋白紧密结合。另外也可将冻干的凝胶磨成粉末,并加入一定量的去离子水。样品可立即用于注射。

(4) 像小鼠这样的小动物,蛋白则需要洗涤并通过电泳转至膜上。

5. 真菌孢子的收集

(1) 用平皿在所需条件下培养真菌以诱导产孢。

(2) 每个平皿加 10～20ml PBS。用灭菌的接种环刮洗孢子,用羊毛纸(glass wool 或 Mira cloth)过滤孢子悬浮液以去除菌丝和分生孢子等。

(3) 滤液转移至离心管 12 000g 离心 5min。

(4) 弃掉上清液并用 PBS 重新悬浮孢子,充分混合并重复 2 次;充分洗涤孢子以去除与菌丝相结合的抗原以免对孢子特异性抗体产生的影响。

6. 调整孢子浓度至 10^6 孢子/ml PBS。

3 制备多克隆抗血清

3.1 物种/菌株的选择及所需动物的数量

虽然有大量的脊椎动物可用作多克隆抗体的制备,但最常用于真菌研究的动物是兔。其原因很多,如兔子容易喂养和操作,安全且可重复放血,用兔制备的抗体容易辨别和纯化。兔子每次注射不需要大量的免疫原就可以产生适量高质量的抗血清。用于制备抗血清的兔子是远系繁殖的,跟近亲繁殖的老鼠相比,其具有更宽范围的 class Ⅱ 蛋白和其他免疫应答反应蛋白。即使在遗传上相同的动物如 BALB/c 老鼠(制备 mAb 所选择的宿主),同一种抗原也会释放出不同的抗体。这些区别在兔子上被放大了。因此,如果能得到大量的抗原,同一个免疫反应则需要好几只兔子,且每只兔子需分别制备抗血清。

3.2 免疫过程、通过放血确定免疫反应及后续操作

一个好的抗原除了上述条件以外还需要三个条件,动物对抗原的免疫反应还依赖于一些另外的因子,这包括剂量、注射的程序和佐剂的应用。对于用兔子制备的 pAb,每次注射需要 50～1 000μg 蛋白。这个数字适用于可溶性蛋白(酶),微粒蛋白(结构蛋白),不溶性蛋白(免疫纯化的串状蛋白),糖类(糖蛋白)和核苷酸结合的运输蛋白。用真菌抗原制备 pAb,最合适的是皮下注射,注射剂可为微粒蛋白和(或)佐剂。佐剂是免疫反应的非特异性的刺激物。佐剂的使用可以稳固抗体反应,是能否引起免疫反应的决定性因子。因此,当使用可溶性抗原或只有少量免疫原时应该用佐剂。对于固体或像孢子这样的器官,则佐剂并不是必需的。最常用的佐剂是 Freund 佐剂,包括完全 Freund 佐剂(CFA)和非完全 Freund 佐剂(IFA)。如果能得到大量的免疫原或已知抗原具有很高的免疫原性,则应用少量的佐剂,比如皂角苷 QuilA(Superfos a/s,丹麦),每剂 25μg。

应在兔子背部进行多次皮下注射。每个免疫反应,每只兔子应在 10 个部位注射含有或

不含佐剂的 800μl 抗原。多克隆抗体通过传统方法在兔子上重复接种同一种抗原而获得，但现在已不受欢迎。对于真菌抗原，典型的免疫反应包括两次注射，间隔 4～6 周，最终放血。注射后，血清样本就可用于检测。检测血样需注射 7～14 天后进行，这与皮下注射抗体滴定所出现的峰相一致。采自耳缘静脉的检测血样应用与检测抗体的 ELISA 相类似的技术检测(见本章方案 4)。来自于不同兔子的血清应与其他滴定检测的血样进行比较，以确定抗体反应的强度(见本章 3.4)。

3.3　血清的准备、纯化、保存

采血后，血样应该放在 4℃凝固和沉积，在这期间，应插入玻璃毛细管以阻止凝块粘到收集管的表面。仔细收集管子中的血清，4℃ 3 000g 离心 5min 去除不溶性物质。血清放在 Eppendorf 管中－20℃保存。血清冻存后可保持数年。如果血清马上冻结，则不需加其他防腐剂。然而如果血清放在 4℃或解冻，应加入 0.02%叠氮化钠(NaN_3)。血清不能重复冻融。因此，一旦解冻，样品应放在 4℃。如除去叠氮化钠，可用合适的缓冲液如 PBS 进行透析。

在纯化多克隆抗血清时最常用的方法是硫酸铵沉降法。然而只用此方法不能得到纯的抗体，因为抗体会被分子质量大的蛋白污染。相反，温和的酸性条件下加入像辛酸之类短链脂肪酸，可沉淀除 IgG 之外的大多数血清蛋白。继硫酸铵沉淀法之后的辛酸沉淀法提供了一种简单且高效的准备相对较纯的抗体的方法。方案 2 提供了一种联合沉淀方法。

方案 2　用辛酸和硫酸铵沉淀法纯化抗体

设备与试剂：

1. 透析管　MWCO 12～14kDa。

2. 60mmol/L 乙酸钠缓冲液(pH4.0)　18.0ml 60mmol/L NaOAc，82.0ml 60mmol/L HOAc。

3. PBS。

4. 辛酸(*n*-辛酸)　游离酸溶液(free acid solution，Sigma，C2875)。

方法与步骤：

1. 测量血清的体积(原始体积)。不要一次全部用掉血清。一般 10ml 即可，但要视情况而定。将血清转移至一干净烧杯，加入一个磁棒，置于室温下的磁力搅拌器上。

2. 加入 2 倍体积的 60mmol/L 乙酸钠缓冲液。检测 pH，调至 4.8。

3. 缓慢逐滴地加入辛酸，室温下搅拌 30min。所加辛酸的量由抗血清的量决定。对于兔血清，每 10ml 原液加入 0.75ml，羊血清每 10ml 原液加入 0.7ml，鼠血清每 10ml 原液加入 0.4ml。将会形成白色沉淀。

4. 5 000g 离心 10min。小心倒出并保存上清液。离心后如上清液也仍含有悬浮物，可用玻璃棉(羊毛纸)过滤。

5. 转移上清液至层析管用 PBS 4℃层析过夜。

6. 转移层析过的上清液转移至一新的烧杯中，加入磁棒，放在 4℃的磁力搅拌器上。搅拌抗体溶液的过程中，慢慢加入饱和的硫酸铵溶液至终浓度为原来的一半。继续在 4℃搅拌 6h 或过夜。白色沉淀将形成。

7. 3 000g 离心沉淀 30min。

8. 小心弃去上清液，吸干并用 0.3～0.5 倍原始体积的 PBS 悬浮沉淀。转移抗体溶液至层析管层析 3 次过夜，使透析过程中有充足的空间进行扩散。

9. 转移抗体溶液并离心以去除残留的碎片，用 0.02%(*W*/*V*)叠氮化钠保存抗血清。

3.4 滴度的确定

微滴定培养板，包括缓冲液和清洁剂。

缓冲液的类型及 pH，微滴定管的材质及清洁剂的使用都会对固体支持的免疫反应产生较大的影响。如果对抗原一无所知或知之甚少，用间接 ELISA(PTA-ELISA)分析时，微滴定管固定时最合适的缓冲液是 PBS(pH7.0，见本章方案 1)。这也许是动物接种表面洗涤物、培养过滤物或冻干菌丝提取物等含有不同种类的抗原时的常见情形。准备的样品中含有高浓度的具有免疫原性的糖蛋白时，则 ELISA 过程中使用的微滴定管具有较高的结合糖蛋白的能力。像排管等用于特殊目的微滴定管则不适用于此目的。对于纯化的蛋白或割自 PAGE 胶上的蛋白质条带，最合适的缓冲液是重碳酸盐(pH9.6，见本章方案 3)。用间接 ELISA 分析及用微滴定管结合蛋白时，如果重碳酸盐缓冲液中含有 PBS，真菌蛋白质的固定达到最好的效果(见本章方案 3)。在固定过程中，如果抗原提取物中含有洗涤剂则会协助或阻止真菌抗原结合到管壁上。因此，洗涤剂的有无对间接 ELISA 来说是至关重要的。相反，漂洗或稀释缓冲液中的洗涤剂对初级或次级抗体酶的结合物结合到塑料表面是必要的。

对任一抗原-抗体的相互作用过程进行优化，可通过在酶联免疫检测中测到其最大吸光度来进行。这适用于本章方案 3 的间接 ELISA 和方案 10 的双抗 ELISA(DAS-ELISA)。在两种分析方法中，我们可以假定我们所处理的是抗体过量的情况，也就是说，将兔 pAb 或表面的杂种瘤稀释 1 000 倍(见本章 4.6)。在这种情况下，抗原过量可能导致不适合于抗体-抗原相互作用。

方案 3 用 ELISA 测定 pAb 的滴度和检验上清液中的 mAb

设备与试剂：

1. 微孔培养板(每排 12 孔)、多孔架或平底盘。

2. 体积可调的(50～100μl)多通道移液枪。

3. PBST 10×PBS 含有 0.05%(*V*/*V*)Tween 20，用前稀释。

4. 重碳酸盐缓冲液 每升水中含 1.59g Na_2CO_3 和 2.9g $NaHCO_3$，pH9.6。

5. 封闭液 PBS 中含有小牛血清蛋白(BSA，Sigma A 7030)或酪蛋白(BDH 440164R)。

6. 带有 450nm 滤光器的酶标仪(MRX-Ⅱ，Dynex Technologies)。

7. 山羊抗兔免疫球蛋白 IgG 或山羊抗鼠多价(IgG、IgA、IgM)过氧化物结合物(Sigma A6154 和 A0412)。

8. 过氧化物底物缓冲液 5ml H_2O，5ml 0.2mol/L 醋酸钠，195μl 0.2mol/L 柠檬酸，5μl 30%H_2O_2。

9. 过氧化物底物溶液 10mg 3,3′,5,5′-4 甲基对二氨基联苯(TMB，Sigma D5879)溶

于 1ml 二甲基亚砜(DMSO,Sigam D5879)。分装后放于冰箱中保存。DMSO 4℃结冰,解冻加入 100μl 底物缓冲液。

10. 底物反应终止液　3mol/L H_2SO_4。

方法与步骤:

1. 在斜面培养基上培养真菌并用 PBS 或碳酸氢盐缓冲液(见本章方案 1)准备表面冲洗物。

2. 用 PBS 或碳酸氢盐缓冲液将冲洗物稀释 10 倍,移取 50μl 至微孔板。轻轻敲打确保均匀分布。放进塑料袋中并封口,4℃温浴过夜或 37℃1h。

3. 颠倒培养板使加入的 PBST 至孔边缘,用手轻甩弃去水分,放置 5min。用 PBST 重复洗两次,再分别用 PBS 和水各洗 1 次,在每次洗后都静置 5min。弃去水分,在室温 23℃±2℃的超净工作台上吹干或用 ELISA 继续下面步骤。干燥的培养板可在封好的塑料袋中 4℃保存数月。

4. 一旦培养板用 100μl 封闭液封闭后,继续下面初始抗体的培养步骤:

(1) 对于 pAb 滴度的测定,在孔 2 至 12 加入 50μl 的 PBST。孔 1 加入 100μl PBST 稀释的血清。对照孔加入相同稀释倍数的预免疫的血清或商业兔血清。从孔 1 移取 50μl 到孔 2,用移液枪充分混匀,避免起泡。重复 3 次,从孔 2 移取 50μl 至孔 3。重复此操作直至孔 11。孔 11 混合好后,移取 50μl 并弃掉,孔 12 只含 PBST。

(2) 要测试 mAbs,每孔加入 50μl 杂交瘤上清液。对照加等体积的无 mAb 的组织培养液或不与已知真菌反应的 mAb 上清液。

将微孔培养板放于塑料袋中封好,室温放置 1h。

5. 通过颠倒和轻甩并用 PBST 冲洗 4 次(3min 一次)以转移 pAb 和 mAb。

6. 用 PBST 准备稀释 1 000 倍的次级抗老鼠或山羊过氧化物酶结合物,每孔架 50μl,放于塑料袋中封好,室温放置 1h。

7. 用 PBST 洗培养板 3 次,再用 PBS 洗一次,每孔加入 50μl 底物溶液并放在密封好的塑料袋中室温放 30min,每孔加入 50μl 的终止液以终止蓝色反应,溶液将变黄。

8. 在 450nm 测吸光度。

4　制备单克隆抗体

4.1　建立一套“组织培养设备”

成功地建立一套组织培养设施的必要的条件就是清洁设备或装备应只用来组织培养。下面是所需的基础装备:

(1) 一台 37℃ CO_2 培养箱。

(2) 一台装有过滤和紫外线装置等的工作台。

(3) 倒置显微镜。

(4) 液氮罐。

(5) 移液器。

(6) 离心机。

4.2 免疫过程、免疫应答和滴定测定

免疫原的用量、免疫的频率及免疫程序在兔子中会随所使用的抗血清的量的不同而变化，从而影响杂交瘤的产物(见本章 3.2)，但通过 PTA-ELISA 检测免疫反应的程序仍是相同的。虽然在某些情况下老鼠也会用于真菌杂交瘤细胞制备，但最常用的物种还是母鼠 BALB/c。比如，使用家鼠和田鼠种特异性的 mAbs 的混合物并通过 ELISA 或 IF(见本章方案 5)可视化分析已研究了真菌相互关联的种群。将抗原引入到老鼠中的最常用的方法是腹膜注射。由于腹腔有较大体积，因而腹腔注射要比其他部位能更好地扩增免疫原。另外，此种方法不直接将抗原注射到血液系统中，因而特别适用于像孢子、菌丝片段等抗原的应用。抗原应用 250～300μl 的 PBS 稀释，含有 50～200μg 蛋白。对于制备兔 pAb，初次注射应要有佐剂，如每剂 10μg 的 Quil A。老鼠应隔周免疫一次(含佐剂更好)，注射 3～4 次后，应从尾部静脉取血进行验血，并用 ELISA 进行滴定检测(见本章方案 3)。如果老鼠反应效果不错的话，还要进行一次最后加强注射，3 天后将会融合(见本章 4.3)。由于真菌准备物固有的免疫原性的区别，杂交瘤生成的时间也会不同。而在通常情况下，初次免疫到融合形成大约需要 2 个月。

4.3 鼠科杂交瘤的制作

方案 4 讲述一只免疫鼠杂种瘤的制作方法，用以融合骨髓瘤和脾细胞。此方法曾被广泛应用，并成功制取很多真菌抗原的 mAbs。

方案 4 通过 B 细胞-骨髓瘤细胞融合制取鼠科杂种瘤细胞

设备与试剂：

1. 灭菌 10ml 吸液管。
2. 灭菌 30ml 普通塑料管。
3. 灭菌 10ml 圆底离心管。
4. 灭菌 96 孔板。
5. 100μl～1ml 移液枪及灭菌枪头。
6. 体积可调(50～100μl)的多通道移液枪及灭菌枪头。
7. 灭菌解剖刀和镊子。
8. 青霉素链霉素溶液　0.5g 链霉素和 0.3g 青霉素溶于 5ml 无菌水中过滤除菌，用 1.5ml 离心管分装，每管 100μl，冻存。
9. *L*-谷氨酸溶液　灭菌 200mmol/L 的 *L*-谷氨酸溶液，用 1.5ml 离心管每管 1ml 分装冻存。
10. 20%组织培养基(20%TCM)　RPMI 1640 培养基，含 20%小牛抗血清，每 100ml 培养基里面加入 100μl pen-strep 溶液和 1ml 200mmol/L 的 *L*-谷氨酸溶液。用前 37℃温浴。
11. 转头可更换的离心机。
12. SP2/0-Ag-14 骨髓瘤细胞。
13. RPMI 1640 无血清培养基，温浴至 37℃。

14. 聚乙二醇溶液　33%PEG 溶液，可将 PEG 加热至 65℃，然后加入 0.2ml 已加入 0.4ml RPMI 1640 无血清培养基。置于 37℃备用。

15. HAZA 选择培养基　95ml 含有 HAZA 的 20% TCM，可由 γ 射线照射的冻干粉末配制。配成 10ml 溶液时，每瓶含 2.85×10^{-5} mol/L 的重氮丝氨酸和 5×10^{-3} mol/L 的次黄嘌呤。此为 50×原液，用前稀释至工作液浓度。

方法与步骤：

1. 用血球计确定骨髓瘤细胞的浓度，取用处于指数生长期的细胞，细胞总数要达到 10^7/ml。

2. 取一装有 10ml 温暖的 20% TCM 的 30ml 玻璃瓶至饲养动物的房间。

3. 用 CO_2 杀死免疫老鼠，并用 70%的乙醇浸泡老鼠。解剖老鼠并找到脾脏位置，用无菌的镊子及剪刀剪一切口，将脾脏转移至瓶中，迅速回到组织培养室。

4. 将脾脏放在含有 15ml 20%TCM 的 9cm 培养皿中，用无菌注射针头打开脾脏，转移细胞悬浮液至一无菌的 50ml 试管中。

5. 将 10^7 个骨髓瘤细胞转移到 50ml 离心管中。将脾脏细胞转移至一新的离心管中，250g 离心 5min。

6. 倒掉上清液，用 2.5ml 无血清的 RPMI 培养基重悬沉淀，合并两种细胞并混合，用一无菌的 10ml 圆底管 250g 离心 5min。

7. 吹干沉淀并加入 0.3ml 33% PEG 溶液放置 6min，500g 离心 1min。

8. 轻轻吸走 PEG 并用 5ml 无血清的培养基重悬沉淀。慢慢加入培养基以防破坏细胞的融合。用 95ml HAZA 选择培养基稀释 5ml 融合产物，将稀释产物以每孔 100μl 加到 10 个 96 孔板中，并放在培养箱中。

9. 定期检查细胞。3～4 天之内不会出现选择细胞。

(1) 第 1 天融合。

(2) 第 2、3 天淋巴细胞死亡，SP2 细胞发亮。

(3) 第 4、5 天 SP2 细胞死亡。

(4) 第 6、7 天杂种瘤细胞开始出现，此时，培养板的每孔应再加入等体积(100μl)20%的 TCM。

(5) 第 9 天检查含有细胞的细胞板上的小孔。用 ELISA 分析上清液，也可通过倒置显微镜在 10×目镜下检查 1/3 视野中的克隆数目。

4.4　杂种瘤细胞的筛选过程

长久以来，由 IgG 级或亚类免疫球蛋白产生的 mAbs 被认为是最理想的抗体。之所以如此，原因很多，最重要的原因是免疫球蛋白(IgG)的单克隆抗体(mAbs)可以与蛋白 A 强有力地结合，从而可直接与酶和荧光染色的染色体结合而易于纯化。长久以来 IgG mAbs 被认为有很强的特异性，而众多研究表明，对于真菌抗体产物，情形并没有这么简单。与 IgG mAbs 相比，一些 IgA 和 IgM 级的免疫球蛋白对真菌抗原不仅有较高的特异性，而且在某些情况下由于其增高的效价可提高测量分析的灵敏度。IgM 抗体是五聚物，与其他两个单体的 IgG 相比，它有 10 个抗体结合位点。抗体识别同种分子的不同抗原决定基是额外的收获，对于真菌糖蛋白而言，可能结合到同种结构的糖或蛋白部分上。能结合到相同

抗体的不同抗原决定基的 Ig 蛋白的获得可以使操作者在设计不同的实验时具有更大的灵活性。如果在一系列实验式中表现很好的话，则可显著提高抗体的有用性。

在任何抗体的筛选过程中，最重要的是要确定杂种瘤是否分泌针对于目标抗原的单克隆抗体。融合后，杂交瘤细胞在 96 孔板中稀释到 100μl（见方案 4）。大约 1 周后，换用 100μl 新鲜的 20%的 TCM 培养细胞。从第 9 天起先前的细胞就可用于筛选。蒸发后加入至少 50μl TCM 沐浴细胞（不要晾干细胞），初级筛选的抗体悬浮液至少 50μl。由单个融合细胞产生的大量的杂交瘤（通常 300，高时可达 1 000）意味着 PTA-ELISA 方法最适合用初级筛选。当在微滴定管发生免疫反应时，通过 ELISA 方法单克隆抗体可强烈识别抗原，但这不意味着整个细胞免疫荧光过程中都如此。方法中的差异常源于多价结合。同样地，一种方法中无法觉察的交叉反应则会在另一反应中主宰试验的结果。因此，如果抗体最终是用于荧光免疫检测，一旦用 ELISA 方法鉴定得到潜在的候选株，则次级筛选要基于荧光免疫反应。如果用 PTA-ELISA 进行筛选，则可用方案 3 中介绍的方法。用免疫荧光方法筛选单克隆抗体的方法见方案 5。

方案 5　荧光免疫检测

设备与试剂：

1. 照相底片。

2. 固定剂　乙醇/氯仿/3%多聚甲醛溶液（6∶3∶1，体积比）。多聚甲醛溶液的准备：将 2.0g 多聚甲醛固体粉末溶于 20ml 水中，在通风橱中加热至 60～65℃配制 10%的溶液，加入数滴 1mol/L 的 NaOH 直至溶液澄清。冷却后与 PBS 混合以配制 3%溶液。

3. Teflon 包被的玻璃片和盖玻片。

4. 装有 495nm 和 525nm 滤光片的紫外荧光显微镜。

5. 95%甲醇溶液。

6. 封固剂。

7. 山羊抗老鼠多价（IgG、IgA、IgM）、异硫氰酸盐荧光素（FITC）或山羊抗兔（IgG）FITC。

8. PBS 和 PBST。

方法与步骤：

1. 高压灭菌 Teflon 包被的玻璃片，并将玻片放在含有琼脂的 9cm 平板中。移去每孔表面的琼脂，在合适条件培养琼脂与真菌。待真菌长满玻璃片后，小心除去其余的琼脂并在室温下充分风干玻璃片。

2. 把风干的玻璃片放在固定液中固定 3min，95%甲醇溶液中 4min，然后在水中漂洗一下，室温风干。

3. 将玻璃片放在塑料托盘中并用湿的吸水纸保湿。在每孔中加入 mAb 上清液或 PBS 稀释的 pAb。对照用 TCM 或预免疫的血清。封好托盘以防蒸发室温下温浴 30min 到 1h。

4. 用 PBS 洗玻璃片 3 次，每次 5min 并用吸水纸尽量吸掉每孔的 PBS，不要晾干。加入稀释 40 倍的抗兔或抗鼠复合物到每孔中，放回密封的托盘中在黑暗中室温温浴 30min。

5. 重复 4 用 PBS 洗玻璃片并风干。滴一滴封固剂到玻片上加盖盖玻璃片。把封固的玻璃片放在平板中，用锡箔纸封好平板以防止 FITC 的漂白。置于 4℃，紫外光下检查。

4.5　亚克隆、扩增、杂交瘤的常规培养

由于杂种瘤细胞具有其双亲的特性，在体外它将会不确定地繁殖。因此，融合板中的细胞可能来自于分泌不同 mAb 的不同细胞。因此为了分离混合细胞，较早地亚克隆细胞至关重要。亚克隆也可以排除其他不分泌而掩盖分泌抗体细胞的细胞。

方案 6　限制性稀释法亚克隆

设备与试剂：

1. 无菌的 30ml 塑料普通试管(Greiner，201170)。
2. 无菌的 96 孔多孔型培养板(Becton Dickinson，3027)。
3. 1ml 和 100μl 的移液管(Gilson)及无菌的枪头。
4. 无菌的移液管(Becton Dickinson，7551)。
5. 可变量程(50～100μl)多通道移液管(Anachem)。
6. 涡旋混合器，37℃的 20%TCM。

方法与步骤：

1. 向 4 只普通试管中分别移液 5ml、10ml、4ml 和 4.5ml 预热的 20%TCM，并分别标记为 B、C、D 和 E。

2. 移取 50μl 杂交瘤细胞悬液至 B 试管，并用涡旋混合器轻柔混匀。

注意：大多数杂交瘤细胞系在多孔型培养板或培养板的表面生长。为使细胞悬液中含有足够浓度的细胞，首先应使用移液器轻柔吹动水浴的杂交瘤细胞悬液，在操作时，还应注意不要将氧气吹入培养液中。

3. 从试管 B 中移取 100μl 悬液至试管 C 中，并混匀。

4. 从试管 C 中移取 1ml 和 0.5ml 悬液分别加入试管 D 和 E 中，然后混匀。

5. 使用多通道移液器从试管 B 中移取 100μl 稀释的细胞悬液至 96 孔多孔型培养板的各个孔中。当 96 孔培养板半数的孔(大约 5ml)加满后，移取 100μl 试管 C 中的稀释的细胞悬液(剩下的 5ml 是过多的)加到剩下的另一半孔中。对于第二块培养板的孔，用来分散来自试管 D 和 E 中的细胞稀释悬浮液。分别将每块培养板的一半标记为 B、C、D 和 E。在显微镜下检查各孔。

6. 将 2 块培养板转移到 CO_2 培养箱中。培养 5 天后，每孔加入 100μl 新鲜的 20% TCM，再培养 24h 后，检测各孔的细胞克隆，并用“十”字标记。在接下来的几天中要继续检测孔中生长较慢的细胞。

7. 当准备筛选时，细胞悬液应该使用免疫检测法如 ELISA 来检测。

杂交瘤的固有无限繁殖的能力意味着它们需要规则地再次培养到新鲜的 TCM 中，以防止细胞过于拥挤、营养成分的损耗以及 TCM 变黄时显示的酸度增加而使细胞死亡。两个特性使得培养杂交瘤细胞变得简单，第一是杂交瘤细胞不贴壁，第二是它们不产生具有毒害作用的副产物。因此，可简单地通过使用移液器将细胞悬液转移到新鲜的培养液补足营养。

再次培养的第一阶段是扩增选择的杂交瘤细胞，这些细胞是从 96 孔多孔型培养板经过融合和初步筛选后选择出的。然后通过转移到体积一直增加的 TCM 中扩增细胞克隆，直到细胞可以规则地在 Petri 培养板中培养来冷冻或在培养瓶中培养用来大规模收集上清液中的抗体产物。在扩增过程中，FBS 在 TCM 中所占体积的百分比逐渐地从 25%经过 10%降到 5%，在有些情况下甚至还要低。除此之外，再次培养时细胞悬液添加到新鲜 TCM 的

比例可以根据每个细胞系的生长速率及操作者需要来确定。我们知道，扩增和再次培养杂交瘤细胞只是一项简单的实验操作。初学者在正式培养细胞系之前，最好先花费一些时间和经验丰富的组织培养者学习一下，当然程序很简单，很快就可以学会。

一旦96孔多孔型细胞培养板的细胞融合，它们就应该被转移到24孔板中，由于大多数杂交瘤细胞不能耐受突然的体积上的大跃变，因此，我们不建议您将细胞从96孔板直接转移到Petri培养板中。再者，一旦细胞在24孔板融合，它们应当被转移到6孔板，然后再转移到Petri培养板中。有一些杂交瘤细胞在培养过程中会轻微地贴在培养孔的表面，这个问题可通过使用无菌移液枪头细心地来回吸取、排出培养孔中的液体而轻易地解决。当一个细胞系在Petri培养板上生长良好时，可以按1∶1的比例与新鲜的培养液稀释细胞，并监测细胞生长的速度，一般来讲倍增时间通常在12～24h之间。一旦细胞系的特性知道了，就开始将细胞分到更大体积新鲜的TCM中。典型的稀释倍数是1∶5或1∶10，更大的稀释倍数也有可能，不过这决定于个别的细胞系。偶然会有杂交瘤细胞的生长被不明原因所延迟、减缓。造成这种现象的最普遍原因是细菌污染。在这种情况下，塑料培养板的表面会有一层灰色的、斑驳的东西，在高倍镜下观察可以看到大量细菌的存在。大多数细菌污染可以通过在TCM中添加青-链霉素阻止，尽管如此，在这种情况下需要其他的抗生素，首选为庆大霉素，以无菌溶液(Sigma，G1379)形式每100ml TCM中添加100μl。一旦细菌污染被消除(通常在两个再次培养循环后)，其他的抗生素液应该移除。

为了获得大量上清液中mAb的产物，杂交瘤细胞应该在培养瓶中培养。为了使上清液中的抗体达到饱和，在最后收集mAb之前应该允许细胞的死亡。通过离心5min移除细胞后将上清液轻轻倒入玻璃瓶中，在加入0.02%(V/V)NaN_3后，于4℃条件下保存。用此种方式保存的杂交瘤细胞上清液可以保存几年不变质。另外，上清液不能冷冻保存。

4.6 杂交瘤细胞系的长期保存

一旦稳定后，杂交瘤细胞可以在适当培养液中缓慢冷冻，并可在液氮中无限期地储存，在储存后，细胞被迅速解冻并转移至TCM中，如果细胞仍然是具有活力的，就会继续分裂并分泌其特异性产物mAb。冷冻杂交瘤细胞是一个迅速的、无间断的过程。有三个关键因素决定在冷冻过程中细胞的存活：

(1) 在冷冻时细胞处于活跃增长期。

(2) 离心速度(350～400g)由以下公式计算得出：$RCF=0.000\ 012\times R(cm)\times N(r/min)^2$。

(3) 在缓慢冷冻过程中细胞没有被破坏。试图在冰箱中冷冻细胞是不可取的，因为冰箱门会被经常打开或关上，而即使温度的微小升高也将会导致细胞膜的破坏，最终导致细胞死亡。如果一定要用冰箱冷冻最好选择在傍晚进行过夜冷冻，因为这时干扰是最少的。

鼠科杂交瘤细胞的冷冻程序将在方案7中进行阐述。

方案7 冷冻法长期储存的杂交瘤细胞

设备与试剂：

1. 无菌的10ml移液管(Becton Dickinson，7551)。
2. 无菌的50ml Blue Max离心试管(Becton Dickinson，2098)。
3. 200μl移液器和灭菌的枪头。

4. 1ml 冻存管(生工,366656)。

5. 聚苯乙烯盒及棉布。

6. 冻存柱及套管(生工,378441 和 343958)。

7. −80℃冰箱;盛有液氮的液氮罐。

8. 冻存培养液　92% FBS,8%(V/V)二甲基亚砜;在无菌塑料瓶中充分混匀,每份 300μl 分装在无菌 1.5ml 离心管中于−20℃下冷冻保存。

9. 冰。

方法与步骤:

1. 在冷冻的前一天,将细胞培养物重新接种到两个培养皿中,使每个培养皿中的细胞都活跃生长,悬液总体积达到 30ml。在培养皿中接种的细胞浓度度取决于细胞系的生长速度。

2. 悬浮细胞,注意将贴壁的细胞吹离散,小心地将细胞从培养皿中转移到灭菌过的 50ml 离心管中,350g 离心 5min(如果条件允许,在 4℃下离心)。

3. 用移液器吸取所有培养液丢弃,注意不要破坏细胞团。然后缓慢地加入 300μl 冷冻的培养液中重新悬浮细胞团,这些冷冻培养液是在离心时从冰箱中取来的,并一直置于冰上。

4. 将所有的细胞悬液合并到一个试管中,并用移液器轻柔地混匀,并移取 150μl 至冻存管中,重复 4 个冻存管。密封冻存管置于冰上,并准备好铺有棉布的聚苯乙烯盒。将上述冻存管放入聚苯乙烯盒中,立即冻存于−80℃。冷冻细胞过夜至少 16h。

5. 将冷冻的细胞放在带有盖子的容器中并转移到液氮中。

6. 至少 24h 后,从中取一小管于 37℃迅速解冻,或者通过手掌的温暖使其解冻也可,这大约需要 1～2min,绝对不允许解冻的细胞过长时间地停留于原先的冷冻培养液中,因为这将引起细胞的迅速死亡。一旦解冻,迅速转移细胞到盛有 20ml 预温的 10%TCM 的培养皿中。

7. 检查细胞是否成活,死细胞看起来似"鬼影(ghost-like)",形状不规则。活细胞则具有清晰的、明显的细胞膜,看起来很光亮。将细胞放入培养箱中过大约 1h 后再次检测。细胞分裂一旦开始后肉眼将清晰可见。或许也会有一些细胞死亡,24h 后细胞或许就需要如前所述的二次培养。

注意:冷冻同一杂交瘤细胞系的大量副本可使操作者确定每个重复的冷冻瓶中的细胞活力。如果一个冷冻瓶中的细胞在液氮冻存后几天中仍旧可以存活,那么这就可以说明其他瓶中的细胞也可以很好地存活。

4.7　鉴定免疫球蛋白的类别/亚类

鉴定 mAb 的 Ig 类别的最重要原因是为了确定在二次培养之前或之后你所拥有的都是一个纯的细胞系,当然,鉴定 mAb 类别也可以采取其他许多已知的方法,例如在适宜的情况下在某些抗体上的二级共轭物。例如一个间接双-mAb-三文治 ELISA,可能需要使用均有重链特异性的共轭物。为了鉴定在杂交瘤细胞上清液中的 mAb 类别,最合适的方法是俘获 ELISAs 或抗原介导的 ELISAs。后面的这种方法将在方案 8 中详细阐述。

方案 8　应用抗原介导 ELISA 鉴定 Ig 类别/亚类

设备与试剂:

1. 抗原包被的微效价带或板。

2. 兔抗羊 IgG(完整分子)过氧化物酶共轭物。

3. PBS 和 PBST。

4. 过氧化物酶底物及反应终止液。

5. 鼠单克隆抗体同型试剂　这些可以通过很多渠道获得,但是在此讲述的试剂是购自 Sigma 的试剂盒(Sigama,IS0-2),每个试剂盒含有 0.2ml 羊抗鼠 IgG_1、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG_1、IgG_3、IgM 和 IgA pAbs 中的一种。为了长期储存,每个同型应该以 20ml 量冷冻,并且不能反复冻融。

方法与步骤:

1. 将 mAb 上清液加到已经覆盖抗体的培养板小孔中培养 1h。

2. 用 PBST 洗涤 4 次(每次 3min)。

3. 将羊抗鼠免疫球蛋白 pAbs 加到培养板小孔中培养 30min,其中 pAbs 用 PBST 以 1∶3 000的比例稀释过。

4. 用 PBST 洗涤 4 次(每次 3min)。

5. 将兔抗羊过氧化物酶加到培养板小孔中培养 30min,其中兔抗羊过氧化物酶用 PBST 以 1∶1 000 的比例稀释过。

6. 用 PBST 洗涤 3 次,用 PBS 洗涤 2 次(每次 3min)。

7. 将底物加到培养板小孔中培养 30min,停止颜色反应并在 450nm 测定光吸收度。

5　蛋白质和糖类抗原决定簇的特性

mAb 抗原决定簇的特性可以通过化学的或者酶学的方法分析抗原而轻易获得,最常用的方法是高碘酸盐氧化、蛋白酶消化和抗原的热处理,这个处理过程或者在液体中,固定到微滴定管的孔中,或者在通过凝胶电泳和 Western 杂交后分离。这些在方案 9 中阐述。关于真菌抗原使用的更多详细的分析,例如肽-N-糖苷酶(pNGase)或内-β-N-葡萄糖胺酶-H(endo-H)消化在其他地方被阐述。

5.1　高碘酸盐氧化

高碘酸盐氧化包括同步氧化及断裂 C—C 键,这些 C—C 键是紧接自由的羟基或醛基或与羟基临近的酮基。实验室程序和高碘酸盐氧化研究结果的阐述非常复杂,但是在其最简单的事实是,用高碘酸盐处理后 mAb 结合到抗原能力的降低很好地初步证明 mAb 是结合到糖类的抗原决定簇上。相反地,结合力的增加为 mAb 结合到蛋白质抗原决定簇提供了初步证据,如通过移除抗原的糖成分,可以将蛋白质抗原决定簇暴露给 mAb 结合。

5.2　使用链霉菌蛋白酶和胰蛋白酶进行蛋白酶消化

用蛋白酶修饰抗原在一定程度上能降低或消除 mAb 的结合力强有力地证明抗原决定簇含有蛋白质成分。在分析真菌抗原中最常用的两种蛋白酶是从链霉菌(*Streptomyces griseus*)分离出的非特异性蛋白酶以及小牛胰蛋白酶。胰蛋白酶是胰腺的丝氨酸蛋白酶,对含有带正电荷氨基酸链的底物特异敏感。

使用链霉蛋白酶处理有两种方式:一种是使用在用链霉蛋白酶盐溶液固定的抗原上,另一种是使用在用固定到琼脂糖床上链霉蛋白酶处理抗原溶液。这样做的原因是不溶性的链霉蛋白酶处理对 mAb 结合没有效用,导致失效的原因可能是多聚糖与微孔培养板的

脱离，因为微孔培养板的蛋白骨架被消化，而非抗原决定簇自身的消化。

5.3　加热

将可溶性的抗原经过煮沸或高压灭菌热处理后，抗体与其结合的能力下降，这为识别蛋白质抗原决定簇提供了另外的证据。但是，由于糖类抗原决定簇具有高度热稳定性，长时间暴露于高温下会将导致蛋白质降解。因此，热处理对 mAb 结合力的作用效果只能被用作 mAb 结合到蛋白质抗原决定簇补充证据。

5.4　适度碱性水解(β-消除)

中度的碱性水解导致多聚糖和丝氨酸或苏氨酸之间的碳氧共价键断裂，而不是多聚糖和酪氨酸、羟(基)赖氨酸、羟(基)脯氨酸、天冬酰胺酸等其他的碳氧键断裂。

方案 9　通过化学和酶学修饰确定的抗原决定簇的特性

设备与试剂：

1. 抗原包被的微效价带或培养板。

2. PBS 或 PBST。

3. 50mmol/L 的醋酸钠缓冲液 pH4.5　50ml NaOAc(1.7g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ 溶解到 250ml dH_2O)37.0ml+50mmol/L HOAc(0.75g HOAc 溶解在 250ml dH_2O 中)63.0ml。

4. 20mmol/L *m*-高碘酸钠(Sigma,S1878)溶解到 pH4.5 的 50mmol/L NaOAc 缓冲液中。

5. 胰蛋白酶(EC：3.4.21.4)溶液(Sigama,T4424)与 PBS 以 1：2.5 比例稀释，制成 1mg/ml 的溶液。

6. 胰蛋白酶抑制剂(Sigama,T6522)溶解在 PBS 中制成 0.1mg/ml 的溶液。

7. 已经在 4%琼脂糖交联珠(Sigma,P4531)上连接的不溶性的蛋白酶ⅩⅣ及未衍生化的琼脂糖支持物(Sigma,A7299)。

8. 50mmol/L NaOH　0.2g 的 NaOH 溶解在 100ml dH_2O 中。

9. 链霉蛋白酶(链霉蛋白酶ⅩⅣ，EC3.4.24.31，Sigma,P5147)溶解在 PBS 中，使用浓度是细胞板小孔中加入 50μl 抗原溶液时，其中的链霉蛋白达到 0.25U(相当于每 ml 的 PBS 含有 9mg 链霉蛋白固体)。

方法与步骤：

1. 固定抗原的高碘酸盐氧化

(1) 将 50μl 高碘酸溶液加到抗原包被的细胞板小孔中，在 4℃密封的塑料袋中共孵育适当的时间，孵育对照组和醋酸盐缓冲液处理组的孔数要数量相当。

(2) 用 PBS 将孔洗涤 4 次(3min/次)，然后用 ELISA 测定分析。

2. 固定抗原的蛋白酶消化

(1) 将 50μl 链霉蛋白酶液或胰蛋白酶液加到抗原包被的细胞板小孔中，在 37℃和 4℃密封袋子中共孵育 4h，孵育的对照组和 PBS 组的孔数要相当。

(2) 用 PBS 将孔洗涤 4 次(3min/次)，对于胰蛋白酶处理的小孔要加 50μl 的胰蛋白酶抑制剂，在 RT 条件下孵育 10min，然后再用 PBS 洗涤 3 次，随后可用 ELISA 测定分析每孔(方案 3)。

3. 抗原提取物的链霉菌蛋白酶消化

(1) 通过在 PBS 中反复离心和重悬将链霉菌蛋白酶包被的琼脂糖层析珠洗涤 3 次，准备含有 10mg 层析珠/ml 缓冲液的悬浮液和含有未衍生化的琼脂糖的对照组。向每 9ml 的抗原溶液中加入 1ml 的琼脂糖层析珠或对照组琼脂糖悬液，在 4℃和 37℃条件下混合共孵育 4h。

(2) 通过离心将琼脂糖支持物移除，并移取 50μl 上清液样品到微滴定板孔中进行固定、洗涤及用 ELISA 测定。

4. 煮沸

(1) 在 PBS 中溶解抗原提取物并煮沸，在 10min 的间歇中，移除样品，冷却，12 000g 离心 5min。

(2) 移取 50μl 上清液样品到微细胞板的孔中进行固定、洗涤及用 ELISA 测定。对照组的孔应只含有未处理过的提取物。

5. β-消除

(1) 向抗原包被的微细胞板的孔中加入 50μl 浓度为 50mmol/L 的 NaOH，在 RT、密封塑料袋中孵育 24h。

(2) 用 PBS 洗涤培养板 3 次(3min/次)并用 ELISA 法测定。

6 其他经常使用的免疫学分析方法

除了在本章中描述到的免疫学分析方法以外，其他一系列的免疫学分析方法也发展起来，用于真菌学研究。这些分析方法和它们不同的排列在其他地方还有更加详细的阐述，在这些分析方法中双-抗体-三文治 ELISA(DAS-ELISA)已经被广泛应用，方案 10 讲述了用 mAb 作为抗原俘获，或者用二级 mAb 或者 pAb 作为探针的典型的间接 DAS-ELISA。

方案 10 间接 DAS-ELISA

设备与试剂：

1. Immunlon 2HB 平底细胞培养板。
2. 多通道可调(50～100μl)移液器(Anachem)。
3. 450nm 波长的微型培养板读数器。
4. PBS 和 PBST。
5. 羊抗兔 IgG(完整分子)过氧化物酶共轭物(Sigma，A6154)。
6. 羊抗鼠 Ig(重链特异性)过氧化物酶共轭物　抗鼠 IgG(γ 链特异性)过氧化物酶(Sigma，A3673)，抗鼠 IgA(α 链特异性)过氧化物酶(Sigma，A4789)，抗鼠 IgM(μ 链特异性)过氧化物酶(Sigma，A8786)。
7. 过氧化物酶反应底物及颜色反应终止液。

方法与步骤：

1. 向微型培养板的每个孔中加入 50μl 的俘获 mAb 上清液，轻敲培养板使溶液均匀分散到孔的整个表面，4℃过夜孵育使抗体固定，洗涤和干燥培养板，抗体包被的培养板可密封于塑料袋中存放于 4℃。
2. 向每个孔中加 100μl 阻断液，在密封塑料袋中于室温条件下阻断 10min 至 1h。
3. 移除阻断液并加入 50μl 抗原提取物[a]，在室温条件下于密封的塑料袋中孵育 1h。

4. 用 PBST 洗涤每孔 4 次(3min/次)。

5. 加入 50μl 溶解在 PBST 中的探针 pAb 或探针 mAb 上清液[b]，在室温条件下于密封的塑料袋中孵育 1h。向 pAb 稀释液中加入的阻滞剂可随意。

6. 用 PBST 洗涤每孔 4 次(3min/次)。

7. 加入 50μl 用 PBST 以 1∶5000 稀释的抗鼠过氧化物酶共轭物，或者 50μl 用 PBST 以 1∶2000 稀释的抗鼠 Ig(重链特异性)[c]过氧化物酶共轭物，在室温条件下于密封的塑料袋中孵育 1h，向 PBST 中加入的阻滞剂可随意。

注意：二级酶共轭物的使用浓度应该尽可能使每个抗体-抗原都能发生反应。

8. 用 PBST 洗涤每孔 3 次(3min/次)，用 PBS 洗涤 1 次，向每个孔中加入 50μl 反应底物，在室温条件下培养 30min，停止颜色反应并在 450nm 处测定光吸收度。

注：

a. 对于 DAS-ELISA，抗原通常被溶于 PBST 中，即使不考虑使用的提取缓冲液，也必须含有洗涤剂以防止抗原的非特异性结合。

b. 使用合适的 pAb 的稀释液应该尽可能使每个 DAS-ELISA 都能发生反应，最好用方案 3 中的规律通过效价来确定，稀释一般以 1∶1000 或更大的比例。

c. 对于 DAS-ELISA，第二个探针 mAb 必须与俘获 mAb 属于不同的类别，除非探针 mAb 直接共轭结合到酶的共轭点。例如，如果 IgA 免疫球蛋白被用作俘获种类，那么探针种类就必须属于 IgM 或 IgG 类别，具体原因是抗鼠多价体(IgG、IgA、IgM)酶共轭点，如在 PTA-ELISAs 中使用的那样，在三文治中是不能区别俘获和探针 mAb 的，而这将会导致非特异性的结合。然而，在商业上能够区分不同 Ig 类别的重链[γ(IgG)、α(IgA)、μ(IgM)]特异性的酶共轭物是可以得到的。

7　抗体的提供及其商业发展

对于真菌病原体的一系列诊断检测方法包括抗体和建立在核酸基础上的技术已经被汇编，并且可以在 COST823 真菌诊断数据库：www. dsmz. de/COST 中找到。关于 mAbs 对 *Botrytis*，*Cladosporium*，*Pseudocercosporella*，*Septoria*，*Penicilliun*，*Aspergillus* 和 *Humicola* 可供性的更详细资料可从 Dr F. M. Dewey 处获得，它的地址可从 COST 网上查到。

在过去的几十年中，许多的商业公司已经建立，使得将 pAb 和 mAb 产品提供给客户代理的抗原和蛋白序列成为一项收费项目。抗原一般以冻干、溶液或 PAGE 凝胶切片的形式运输传递。对于 pAb 产品，顾客可以选择他们喜欢偏好的宿主动物(兔、小鼠、绵羊、山羊、母鸡或大鼠)。由于免疫接种程序典型要持续 3 个月，我们为满足客户的需要制作了免疫接种的步骤。预免疫血清根据在第三次免疫接种得到的测试血清被提供，单克隆抗体产品已被制成标准尺寸并在不同的状态下即免疫接种、融合、筛选和杂交瘤的选择、克隆即同型化获益。上清液在克隆程序之前和之后被提供以进行 mAb 选择，客户收到的是相应的克隆杂交瘤及其同型。

第十一章　丝状真菌的功能基因组分析

功能基因组分析的目的是了解生物生长发育的某个阶段，或者某种器官、组织，或者某类细胞中基因表达状况。丝状真菌是多细胞真核生物，在其生活史中可以生长发育形成形态和功能不同的细胞结构，行使不同的生理功能。分析丝状真菌的功能基因组，可以使人们了解丝状真菌特定生长发育阶段基因表达的状况，对于揭示基因的特性、基因表达类型和强弱对真菌生长发育的影响和生理功能发挥之间的关系非常重要，并为进一步调控某些重要基因提供理论基础。随着多种生物基因组序列测定工作的完成，许多功能基因组的研究技术迅速发展起来，并在丝状真菌的研究中得到大量应用。

下面以稻瘟病菌为例，简述稻瘟病菌致病相关基因的研究方法。

1　构建稻瘟病菌突变子库

构建稻瘟病菌突变子库是分离稻瘟病菌致病相关基因的一种常规办法，主要有：限制性酶介导的插入突变(REMI)技术、基因捕捉(gene-trap)技术、农杆菌介导转化(ATMT)技术、转座子标签(transposon tagging)技术(Villaba et al.，2001)等。Shi 利用插入突变技术获得 880 个突变子，从中鉴定了 5 个产孢突变子：con1-B、con4、con5、con6、con7。Balhadere 等利用插入突变构建了一个具有 3 527 个转化子的稻瘟病菌 REMI 文库。在所鉴定的 5 个突变子中，2 个附着胞功能下降，2 个孢子形态、孢子发生和附着胞功能发生变化，另一个为甲硫氨酸营养缺陷突变体。Orbach 等利用启动子捕捉(promotor trap)技术试图建立一个有 5 万个插入突变子的突变子库，在已分析的 1 000 个转化子中，小于 1%转化子显示出致病性缺陷。刘小红利用启动子捕获技术获得了 1 077 株稻瘟病菌突变体，其中有 18 株突变子的致病性有所降低。李宏宇等对 1 520 个 ATMT 突变体进行形态变异观察，发现菌落颜色突变的有 15 个；随机取 58 个突变体进行比较，发现产孢量减少的 4 个，孢子萌发率降低的 8 个，附着胞形成率降低的 9 个。Villaba 等利用转座子标签技术标记了参与稻瘟病菌侵入水稻叶片的 *ORP1* 基因。李宏宇等对微波诱导产生的突变体研究发现：突变体 1-40-271 菌落呈白色，产孢与萌发均正常，但萌发后即便在人工疏水表面上也不能形成附着胞，且丧失了致病性；突变体 2-20-6 菌落呈黄色，孢子萌发率为 1%，萌发的孢子其附着胞形成率仅为 0.01%，致病性减弱。

2　目标突变技术

最近，通过不同生物种间基因的同源性比较，利用稻瘟病菌基因组文库序列和 PCR 技术克隆稻瘟病菌目标基因，并通过基因替代、EGFP 融合蛋白和基因互补等方法研究基因的功能，成为稻瘟病菌基因功能研究的一条快速途径。由于稻瘟病菌 EST 测序的大规模进行和稻瘟病菌基因组序列测定的完成，又出现了一种新的基因克隆和功能分析方法，主要研

究过程是先在 NCBI 等基因数据库中搜索已知的在某一阶段(如附着胞)特异表达的 EST 序列,再利用稻瘟病菌基因组文库设计引物克隆相关基因的启动子,构建启动子-EGFP 表达载体,转化稻瘟病菌,研究其是否特异表达,若是,再用基因替换法等进行功能分析。Banno 等以此法研究了附着胞 EST 库中的 12 个基因,发现有 9 个基因在附着胞中表达,其中 1 个基因为附着胞特异表达。

3　cDNA 文库构建及测序分析

稻瘟病菌附着胞及侵染相关的各种 cDNA 文库和差减文库的构建和测序分析成为研究稻瘟病菌与植物相互作用的一种非常有效的技术。Kim 等对 511 个来自感染稻瘟病菌的水稻叶片的 cDNA 文库的克隆进行了 EST 测序,并对其中参与水稻侵染过程的稻瘟病菌基因进行了分析:在总共得到的 296 个非冗余 ESTs 中,72 个为真菌基因,表达丰度最大的一个稻瘟病菌基因为 *N. crassa* GRG1 基因的同源基因。在 Dean's 实验室,对构建自稻瘟病菌感染的水稻叶片(接种孢子 48 小时后)的 cDNA 文库的 619 个克隆进行了 5′端 EST 测序,其中 359 个基因以前未被描述过,但只有 20 个在 GenBank 中有显著的真菌同源基因。Kamakura 等把在玻璃纸上萌发 2.5h 的孢子 cDNA 与在液体培养时萌发的孢子cDNA 进行差减杂交,得到一个 686 个克隆的差减文库,并对其中 158 个独立克隆的 EST 序列进行了部分测序分析。

在 EST 测序基础上,利用基因芯片(gene chip)技术大规模筛选稻瘟病菌不同发育阶段差异表达基因成为一种有效的手段。Takano 等用 3 500 个稻瘟病菌 cDNA 组成的基因芯片检测稻瘟病菌附着胞形成过程中的基因表达谱:发现 85 个基因的转录本在未萌发孢子和正形成附着胞阶段中比在植物中生长的菌丝中要丰富得多;18 个基因在未萌发孢子中的表达量比形成附着胞过程中高;47 个基因的转录本在正形成附着胞中的数量要比未萌发的孢子丰富得多。

方案 1　构建附着胞 cDNA 文库的 cDNA 的合成

设备与试剂:

1. Smart™ cDNA library construction kit　Clontech 公司。

2. CM 培养基。

3. 70%乙醇溶液、80%乙醇溶液和 95%乙醇溶液。

4. Trizol 试剂　MRC 公司,美国。

5. 液氮。

6. DEPC。

7. 10×MOPS/EDTA 缓冲液[MOPS:3-(n-morpholinos)propanesulfonic]　0.2mol/L MOPS (41.86g),0.05mol/L NaOAC · $3H_2O$(4.10g),0.01mol/L EDTANa_2 · $2H_2O$ (3.72g),用 NaOH 调 pH 到 7.0,加 ddH_2O 至 1L(Smart™ cDNA library construction kit, Clontech 公司)。

8. 1%二甲苯青 FF。

9. λ 噬菌体包装盒　MaxPlax™ Lambda Packing Extracts(Epicentre, USA)。

10. 500×卡那霉素贮存液(25mg/ml),−20℃。

11. 1000×四环素贮存液(15mg/ml),−20℃。

12. 1000×氯霉素贮存液(34mg/ml),−20℃。

13. LB 液体培养基　10g/L 胰蛋白胨,5g/L 酵母提取物,5g/L 氯化钠,pH7.0(用 5N NaOH 调节),灭菌。

14. LB 固体培养基　LB 液体培养基,加琼脂 15g/L,灭菌,倒平皿,4℃保存。

15. LB/tet 平板　LB 固体培养基冷却至 50℃,加四环素(终浓度为 15μg/ml),倒平板,4℃保存。

16. LB/kan/can 平板　LB 固体培养基冷却至 50℃,加入卡那霉素(终浓度为 50μg/ml)和氯霉素(终浓度为 34μg/ml),倒平板,4℃,保存。

17. 1mol/L $MgSO_4$ 贮存液　溶解 24.65g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 到 100ml 无菌水中,过滤灭菌。

18. 20%麦芽糖贮存液　溶解 20g 麦芽糖到 80ml 无离子水中,加水至 100ml,过滤除菌,4℃保存。

19. LB/$MgSO_4$ 平板　1L LB 液体培养基中加入 10ml 1mol/L $MgSO_4$(终浓度为 10mmol/L)、15g 琼脂,高压灭菌,倒平板,4℃保存。

20. LB/$MgSO_4$ 液体培养基　1L LB 液体培养基中加入 10ml 1mol/L $MgSO_4$,高压灭菌。

21. LB/$MgSO_4$/麦芽糖液体培养基　1L LB/$MgSO_4$ 液体培养基,高压灭菌,冷却至 50℃,加入 10ml 20%麦芽糖母液(终浓度为 0.2%)。

22. LB/$MgSO_4$ 软性琼脂(top agar)　1L LB 液体培养基中加入 10ml 1mol/L $MgSO_4$、7.2g 琼脂,高压灭菌,4℃保存。

23. 10×λ 稀释液

NaCl	58.3g	1mol/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	24.65g	0.1mol/L
Tris-HCl(pH 7.5)	350mL 1mol/L 母液	0.35mol/L

加水至 100ml,高压灭菌,4℃保存。

24. 1×λ 稀释液

100ml	10×λ 稀释液
5ml	2%白明胶(终浓度为 0.01%)

加水到 1L,高压灭菌,4℃保存。

25. 100% DMSO。

方法与步骤:

1. 附着胞 RNA 的提取

(1) 稻瘟病菌附着胞的收集和研磨。

(2) 加入 2ml Trizol,室温放置 5min,使其充分裂解。

(3) 8 500r/min 离心 5min,弃沉淀。

(4) 按 200μl/ml 在 Trizol 中加入氯仿,振荡混匀 15s,室温放置 3min(不能用涡旋振荡器,以免基因组 DNA 断裂)。

(5) 4℃ 8 500r/min 离心 15min。

(6) 吸取上层水相至另一离心管中。

(7) 按 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 加入异丙醇混匀，室温放置 10min。

(8) 4℃ 8 500r/min 离心 10min，弃上清液，RNA 沉于管底。

(9) 按 1ml 75%乙醇溶液/ml Trizol 加入 75%乙醇溶液，温和振荡离心管，悬浮沉淀。

(10) 4℃ 6 500r/min 离心 5min，尽量弃上清。

(11) 冰上晾干 10min。

(12) 用适量 H_2O(约 100μl)溶解 RNA 样品。

(13) 测 OD 值定量 RNA 浓度。

(14) −70℃保存。

(15) RNA 甲醛电泳。

2. 长距离 PCR 法合成附着胞 cDNA

(1) cDNA 第一链合成

1) 在 0.2ml 离心管内混合下列成分：

3μl　附着胞总 RNA 样品(约 5.23μg 总 RNA)

1μl　SMART Ⅳ 寡聚核苷酸

1μl　CDS Ⅲ/3′ PCR 引物

总体积为 5.0μl。

2) 混匀，稍离心。

3) 72℃温浴 2min。

4) 冰浴 2min。

5) 混匀，稍离心。

6) 加入下列成分：

2.0μl　5×第一链合成缓冲液

1.0μl　DTT(20mmol/L)

1.0μl　dNTP 混合物(10mmol/L)

1.0μl　PowerScript 反转录酶

7) 总体积为 10.0μl。

8) 混匀，稍离心。

9) 42℃温浴 1h(培养箱内)。

10) 冰浴，中止合成。

11) 反应液−20℃保存。

(2) 长距离 PCR 法 cDNA 扩增

1) PCR 仪(GeneAmp 9600)预热至 95℃。

2) 在 200μl PCR 管内混合下列成分：

2μl　第一链 cDNA

80μl　去离子水

10μl　10×2 型最优 PCR 缓冲液

2μl　50×dNTP 混合物

2μl　5′PCR 引物

2μl　CDSⅢ/3′ PCR 引物

2μl　50×2 型最优聚合酶

总体积为 100μl。

3) 混匀,稍离心。

4) 放入预热至 95℃ PCR 仪。

5) 按下列程序扩增:

95℃　1min,1 个循环;

95℃　15s, 68℃ 6min, 23 个循环。

6) 当反应结束时,取 5μl 反应液在 1.1%胶/EB 电泳分析,用 0.1μg 1kb DNA marker (MBI,Lithuania)作为分子质量标记。

7) −20℃保存 ds cDNA。

(3) 蛋白酶 K 消化

1) 吸取 50μl 扩增的 ds cDNA(2～3μl)到 0.5ml PCR 管内,加 2μl 蛋白酶 K(20μg/μl)。

2) 混匀,稍离心。

3) 45℃温浴 20min。

4) 稍离心,加入 50μl 去离子水。

5) 加入 100μl 酚/氯仿/异戊醇,连续轻轻颠倒混匀 1～2min。

6) 14 000r/min 离心 5min,使混合物分相。

7) 移取上层水相到一个干净的 0.5ml 线管内,抛弃下层和中间层。

8) 加入 100μl 氯仿/异戊醇,连续轻轻颠倒混匀 1～2min。

9) 重复步骤 6)。

10) 重复步骤 7)。

11) 加入下列试剂:

10μl　3mol/L 乙酸钠

1.3μl　糖原(20μg/μl)

260μl　95%乙醇溶液(室温)

立即离心 20min,14 000r/min(室温)。

12) 仔细用枪移去上清液,注意不要扰动沉淀。

13) 用 100%乙醇溶液洗一次。

14) 空气干燥约 10min。

15) 加入 79μl 去离子水,重悬沉淀。

(4) 限制性内切酶 *Sfi* I 消化

1) 在一新的 0.5ml 离心管内混合下列组分:

79μl　ds cDNA

10μl　10×*Sfi* I 缓冲液

10μl　*Sfi* I(20U/μl)

1μl　100×BSA(1μg/μl)

总体积为 100μl。

2) 混匀,50℃温浴 2h。

3) 各加 2μl 1%二甲苯青(xylene cyanol)。

3. cDNA 分级

(1) 标记 16 个 1.5ml 离心管，在架子上顺序安放。

(2) 准备 CHROMN SPIN-400 管的收集过程：

1) CHROMN SPIN-400 试管在室温放置 1h 以上，颠倒混匀数次，完全重悬管内的胶体混合物。

2) 移取管内的空气泡沫。用 1 000μl 移液枪轻轻重悬混合物，避免产生空气泡沫。然后移去底部盖子，让管内的水自然下滴。如果 3min 后滴水停止了，盖上管上面的盖子，使之继续滴水。

3) 把管子放在台架上。

4) 储存缓冲液从管内流出，直至管内基质表面露出。此时，基质上部表面位于管的 1.0ml 标记处。若基质数量太少，则补充至该标记处。

5) 储存缓冲液的流动速率约为每 40～60s 1 滴，每滴的体积约为 40μl。如果流动速率太慢(小于 1 滴/100s)或每滴体积太少(小于 25μl)，则完全重悬基质，重复上述滴的过程，直至达到上述指标。

(3) 当储存缓冲液滴完后，轻轻地沿着管内壁加入 700μl 的过柱缓冲液(column buffer)到管的顶部，使之滴出。

(4) 当过柱缓冲液滴完时(15～20min)，轻轻地、均匀地加入约 100μl 的前述 *Sfi* I 消化的 cDNA 和二甲苯青的混合物到基质的表面中央。

(5) 静置片刻，让样品完全吸收。

(6) 用 100μl 的过柱缓冲液洗盛过 *Sfi* I 消化的 cDNA 和二甲苯青的混合物的离心管，轻轻地把该过柱缓冲液加到基质表面。

(7) 过柱缓冲液从管内滴出，直到树脂上面没有液体剩下。当滴液停止时进行下一步(此时，染料已进入管内约 2mm)。

(8) 把第一个收集离心管直接放在管的出口下方。

(9) 加入 600μl 的过柱缓冲液，立即开始收集。每一离心管收集一滴液滴(约 35μl)，共收集 16 管，收集后盖上盖子。

(10) 检查 cDNA 分级效果：各取 3μl 分层液进行 1.1%琼脂糖/EB 胶电泳，以 0.1μg 1kb(MBI, Lithuania)为分子质量标记，150V 电泳 5～10min。在紫外光下观察 cDNA 条带的浓度，确定分液峰。收集前三个含 cDNA 的分层液(一般为第 8、9、10 个离心管)，集中到一个干净的离心管中。

(11) 在上述含 cDNA 收集液(105～140μl)的离心管内加入下列组分：

1/10 体积的	醋酸钠(3mol/L, pH4.8)
1.3μl	糖原(glycogen, 20mg/ml)
2.5 倍体积的	95%乙醇溶液(−20℃)

(12) 前后轻轻摇动混匀。

(13) −20℃静止 1h 或过夜。

(14) 室温 14 000r/min 离心 20min。

(15) 仔细移去上清液，注意不要扰动沉淀。

(16) 稍离心。

(17) 仔细移去所有液体，空气干燥 10min。

(18) 用 7μl 去离子水重悬沉淀,轻轻混匀。

(19) −20℃保存。

4 cDNA 文库构建及筛选

4.1 cDNA 文库构建

方案 2 cDNA 文库构建

1. cDNA 与载体 λTriplEx 2 的连接

(1) 标记 3 个 0.5ml 离心管(做 3 个连接反应),分别加入表 11-1 所列组分:

表 11-1 连接体系组分组成

组分	连接 1(μl)	连接 2(μl)	连接 3(μl)
cDNA	0.5	1.0	1.5
载体(500ng/μl)	1.0	1.0	1.0
10×连接缓冲液	0.5	0.5	0.5
ATP(10mmol/L)	0.5	0.5	0.5
T4 DNA 连接酶	0.5	0.5	0.5
去离子水	2.0	1.5	1.0
总体积	5.0	5.0	5.0

(2) 轻轻混匀,避免产生气泡,稍离心。

(3) 16℃温育过夜(培养箱)。

(4) 每一个连接反应进行单独的 λ 噬菌体包装反应和滴定。

2. 连接产物的包装

(1) 噬菌体包装使用 MaxPlax™ λDNA 包装试剂盒(Epicentre,USA)。

(2) 每 2 个包装反应,室温解冻一个噬菌体包装蛋白抽提物,然后放于冰上。

(3) 当包装蛋白解冻后,立即吸取包装蛋白的一半(25μl)到另一个新的 1.5ml 离心管,放于冰上。

(4) 加入连接反应产物(5μl 连接液)到含 25μl 包装蛋白的离心管中。

(5) 吹吸混匀几次,避免气泡吹入或产生;稍离心。

(6) 30℃温浴 90min。

(7) 温浴结束时,在 30℃条件下每管加入另外 25μl 解冻的包装蛋白。

(8) 30℃再温浴 90min。

(9) 加入 500μl 噬菌体稀释缓冲液,轻轻涡旋混合。

(10) 加 25μl 氯仿,轻轻涡旋混合。

(11) 4℃保存。

(12) 在合适的细菌菌株上滴定,分析包装的噬菌体。

3. 细菌培养平板准备

(1) 细菌菌株 *E. coli* XL1-Blue 和 BM 25.8(LB 培养基,25%甘油)保存在−70℃。

(2) 菌种活化。划线接种约 5μl 冻存菌种到 LB 含相应抗生素的平板上。

(3) XL1-Blue 菌株:LB/txt 平板。

BM25.8 菌株:LB/kan/cam 平板。

(4) 37℃温育过夜。用 parafilm 封口膜包住平板,4℃保存。这些平板作为初级储存平板。

(5) 准备工作储存平板。从初级储存平板挑取单一菌落,划线接种到另一个含相应抗生素的 LB/$MgSO_4$ 的平板。

(6) 37℃温育过夜。用 parafilm 封口膜包住平板,4℃保存。

(7) 每隔 2 周,从前一个工作储存平板挑取单菌落接种培养产生新的工作储存平板。

4. cDNA 文库滴定

(1) 从工作储存平板(XL1-Blue 菌株)挑取一个单菌落,接种到 15ml 的 LB/$MgSO_4$/麦芽糖液体培养基中培养,37℃,140r/min 摇过夜,直至 OD_{600} 值为 2.0。5 000r/min 离心 5min,去上清液,加入 7.5ml 的 10mmol/L $MgSO_4$ 重悬。

(2) 准备足够的 90-mm LB/$MgSO_4$ 平板。在培养箱内预热至 37℃,并使琼脂表面水分挥发完全。

(3) 用 1×λ 稀释液(dilution buffer)稀释包装的噬菌体产物至合适的稀释度(1∶5 到 1∶20)。对于每一噬菌体包装产物的每一个稀释度按如下步骤进行。

(4) 加入 1μl 稀释噬菌体到 200μl XL-Blue 菌过夜培养液,37℃温浴 10～15min。

(5) 加入 2ml 融化的 LB/$MgSO_4$ 软性琼脂(top agar,<45℃),迅速颠倒混匀,立即倾倒在 37℃的 LB/$MgSO_4$ 平板上,迅速旋转平板使软性琼脂均匀分布。

(6) 室温冷却 10min,倒置平板,37℃温育 6～18h。周期性检查,保证噬菌斑生长。

(7) 统计噬菌斑,计算噬菌体的度(pfu/ml)。

(8) 滴度(pfu/ml)=(噬菌斑数量×稀释倍数×10^3μl/ml)/倒平板的稀释噬菌体体积 μl。

(9) 比较 3 个连接反应的滴度,确定最佳的载体/cDNA 比例。

5. 重组子比例的测定

按照前述 cDNA 文库滴定的过程,在 LB/$MgSO_4$ 平板上进行 *E. Coli* XL1-Blue 的 blue/white 筛选。在铺噬菌体+细菌混合物前,加 IPTG 和 X-gal 到融化的 LB/$MgSO_4$ 平板上。每 2ml 的融化的软性琼脂(top agar),各加 40μl 3% X-gal 和 7μl 20% IPTG。以形成 500～1 000噬菌斑/90mm 平板为目标铺平板。37℃温育 5～18h,或直到噬菌斑和蓝色出现。由白(重组)/蓝(非重组)比例估计重组效率。

6. cDNA 文库扩增

(1) 从初级储存平板上取一个单个的、分离的 XL1-Blue 菌落,接种到 15ml LB/$MgSO_4$/麦芽糖液体培养基内培养。37℃,140r/min 过夜,直至 OD600 达到 2.0。5 000r/min 离心 5min。倾去上清液,用 7.5ml 10m $MgSO_4$ 悬浮细菌。

(2) 按一个 1×10^6 克隆的文库需要 20 个 150 mm 平板准备 LB/$MgSO_4$ 琼脂平板,在培养箱内加温至 37℃,并且使琼脂表面干燥。

(3) 准备相应的足够数量的装有 500μl 过夜细菌培养液的 4ml 管和足以使每个 150mm 平板产生 6～7×10^4 个噬菌斑的裂解噬菌液,混合。

(4) 37℃水浴 15min。

(5) 每管加入 4.5ml 融化的 LB/$MgSO_4$ 的软性琼脂。

(6) 迅速混匀,立即把细菌-噬菌体混合物倾倒在 LB/$MgSO_4$ 琼脂平板上。同时,迅速旋转平皿,使琼脂均匀分布在平板上。

(7) 室温冷却平板 10min。倒置平板,37℃温育 6～18h,直至噬菌斑融合。

(8) 每个平板加入 12ml 1×λ 稀释液,4℃放置过夜。噬菌体在 1×λ 稀释液中汇集成一个扩增的文库溶菌液。

(9) 把平板放在摇床上,室温,约 50r/min,摇 1h。

(10) 把 λ 噬菌体溶菌液倒入一个无菌大烧杯,形成一个扩增的文库溶菌液。

(11) 裂解剩余完整的细菌细胞,纯化噬菌体产物。

1) 混合噬菌体裂解产物。

2) 并倒入无菌的 50ml 聚丙烯离心管。

3) 加入 10ml 氯仿。

4) 盖上盖,旋涡 2min。

5) 7 000r/min(或 5 000g)离心 10min。收集上清液到另一干净的 50ml 离心管,盖紧盖子,放于 4℃。

7. 扩增文库的滴定

(1) 从工作储存平板(XL1-Blue 菌株)挑取一个单菌落,接种到 20ml 的 LB/$MgSO_4$/麦芽糖液体培养基(不含抗生素)中培养。

(2) 37℃,140r/min 培养过夜,直至 OD600 值为 2.0。

(3) 5 000r/min 离心 5min,去上清液。

(4) 加入 7.5ml 的 10mmol/L $MgSO_4$ 重悬细胞。

(5) 准备 9～14 个 90 mm LB/$MgSO_4$ 平板。在培养箱内预热至 37℃,并使琼脂表面水分挥发完全。

(6) 准备噬菌体裂解液(文库)的稀释度。

1) 吸取 10μl 文库裂解液到 1ml 的 1×λ 稀释液中(稀释液 1 = 1∶100)。

2) 吸取 10μl 稀释液 1 到另一个 1ml 的 1×λ 稀释液中(稀释液 2 = 1∶10 000)。

3) 把稀释液 2 和 XL1-Blue 过夜培养液按表 11-2 配成 4 个组别放入离心管内。

表 11-2 滴度测定配比组成

1×λ 管	1×λ 稀释缓冲液	细菌过夜培养物	菌体稀释 2
1	100μl	200μl	5μl
2	100μl	200μl	10μl
3	100μl	200μl	20μl
4(对照)	100μl	200μl	0μl

(7) 37℃水浴 15min。

(8) 每一管内加入 3ml 融化的(45℃)LB/$MgSO_4$ 的软性琼脂。

(9) 迅速混匀,并立即倾倒在一个 LB/$MgSO_4$ 琼脂平板上。迅速旋转平板,使琼脂均匀分布。

(10) 室温冷却 10min。

(11) 37℃倒置培养 6～7h。

(12) 计数噬菌斑,按下列公式计算滴度(pfu/ml)。

滴度(pfu/ml)=(噬菌斑数量×稀释倍数×10^3μl/ml)/倒平板的稀释噬菌体体积 μl。

8. cDNA 文库的保存　噬菌体文库混合液内加入 DMSO 至最终浓度为 7%，以 1ml/管分装于 2.0ml 冻存管，−70℃保存。

方案 3　质粒 pTriplEx2 的插入片段的验证

1. 噬菌体 λTriplEx2 转变为质粒 pTriplEx2

(1) 从工作储存平板(BM25.8 菌株)挑取一个单菌落，接种到 10ml 的 LB 液体培养基(50ml 试管)中培养。31℃，150r/min 培养过夜，直至 OD_{600} 值=1.1～1.4。

(2) 加 100μl 1mol/L 的 $MgCl_2$ 溶液到 10ml BM25.8 菌株的过夜培养物中。

(3) 从二级或三级筛选平板中，挑取一个完全分离的明确的噬菌斑到 350μl 的 1×λ 稀释液，涡旋混匀噬菌斑，37℃静止温浴 3～4h，或 4℃过夜，制成噬菌体稀释液。

(4) 在一个 20ml 试管内混合 200μl 过夜细菌培养物和 150μl 噬菌体稀释液。

(5) 31℃静止温浴 30min。

(6) 加 400 μl LB 液体培养基。

(7) 在摇床内，225r/min，31℃温育 1h。

(8) 取 1～10μl 上述感染细胞涂于 LB/羧苄西林平板，31℃培养过夜。

(9) 从每一个克隆中，挑取分离的单菌落数个，用 CTAB 法提取质粒 DNA 并电泳确认。质粒供限制性内切酶酶切及直接测序使用。

2. CTAB 法抽提质粒

(1) 用无菌牙签挑取分离的单菌落接种到 5ml LB 液体培养基(含 100μg/ml Amp)中，37℃振荡培养 12h 至对数生长后期。

(2) 将 1.5ml 过夜培养菌液加入 1.5ml Eppendorf 管中，12 000r/min 离心 30s，弃去上清液，将离心管倒置使上清液全部流尽。

(3) 加入 200 μl STET(含糖)，充分悬浮菌体，加入 4μl 溶菌酶(10 mg/ml)，颠倒混匀，室温放置 5min。

(4) 沸水煮 50s，12 000r/min 离心 10min。

(5) 用牙签去除沉淀，上清液加入 5μl RNA 酶(10mg/ml)，颠倒混匀。

(6) 68℃水浴 10min，加入 10μl CTAB(5%，*W*/*V*，水)，混匀室温放置 3min，12 000r/min 离心 5min。

(7) 沉淀悬浮于 300μl 1.2mol/L NaCl 溶液中，旋涡混匀。

(8) 加入 750μl 无水乙醇，室温放置 5min，12 000r/min 离心 2min。

(9) 沉淀用 500μl 70%乙醇溶液冲洗，12 000r/min 离心 2min。

(10) 沉淀于空气或温箱中干燥后，溶解于 20μl TE 或 ddH_2O 中。

(11) STET 配方：

8%(*W*/*V*)蔗糖

5%(*V*/*V*)Triton X-100

50mmol/L EDTA(pH8.0)

50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)

(12) 过滤除菌，并于 4℃保存。

3. 限制性内切酶 *Sfi* I 消化和电泳

(1) 在一新的 1.5ml 离心管内混合下列组分：

14.3μl	H_2O
3μl	质粒(pTriplEx2)DNA
2μl	10×*Sfi* I 缓冲液
0.5μl	*Sfi* I(20U/μl)
0.2μl	100×BSA(1μg/μl)

总体积为 20μl。

(2) 混匀，50℃温浴 2h。

(3) 各取 5μl 电泳，以 1kb DNA Marker(MBI, Lithuania)作对照。

4.2 部分重组 pTriplEx2 质粒的测序和 EST 序列分析

重组质粒的 3′端序列直接用 T7 引物，在 ABI 377 DNA 测序仪(Applied Biosystems, USA)上测序。

原始 EST 序列用 VecScreen 程序(NCBI)分析，去除载体序列(pTriplEx2)，然后除去引物序列(5′ PCR primer 和 CDS Ⅲ/3′ PCR primer, Clontech, USA)。得到的稻瘟病菌附着胞阶段的 cDNA 的 EST 序列用 BioEdit 序列(Hall, 1999)进行 contig 重组。处理过的 EST 序列分别在 GenBank 数据库、Phytopathogenic Fungi and Oomycete Database in COGEME(http://cogeme.ex.ac.uk/index.html)、*Magnaporthe grisea* Database(http://www.broad.mit.edu/ annotation/fungi/ magnaporthe)用 BLAST 程序(Altshul et al., 1997)进行相似性分析。

5 抑制差减杂交技术

通过 cDNA 消减杂交的方法剔除相同基因而将差异表达基因富集后形成的文库，可将参与生命现象的特征性基因完整纳入文库进行研究，对从基因角度认知生命现象具有重要价值。基于差减抑制杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)的方法构建差减 cDNA 文库是近年来发展起来的进行功能基因组学研究的有效方法之一，通过一次差减杂交可使低丰度的序列(mRNA)得以高于 1 000 倍的富集，有效的选择性扩增目标序列，同时抑制非目标序列的扩增，因此，在分离基因特别是分离低丰度差异表达基因方面具有更广阔的应用前景。

5.1 抑制差减杂交技术的基本原理及主要步骤

由于抑制差减杂交技术在试验组的 cDNA 在进行杂交之前等分的两份加有不同的接头，因此杂交时将产生 a、b、c、d 和 e 等 5 种不同类型的分子(图 11-1)，当采用与两个不同接头序列互补的引物进行 PCR 扩增时，只有目标序列得到有效扩增，非目标序列因两端存在反向重复序列，退火时易产生类似“发夹”的结构，无法与引物配对，扩增受到抑制。抑制差减杂交(SSH)技术的主要步骤有：

(1) cDNA 的合成酶与酶切；
(2) 试验组 cDNA 分成两份，并与两个不同的接头连接；
(3) 试验组的 cDNA 与过量的驱动组 cDNA 杂交；
(4) 选择性 PCR 扩增与接头相连的试验组 cDNA 分子；
(5) 克隆 PCR 产物，构建差减文库；
(6) 筛选文库。

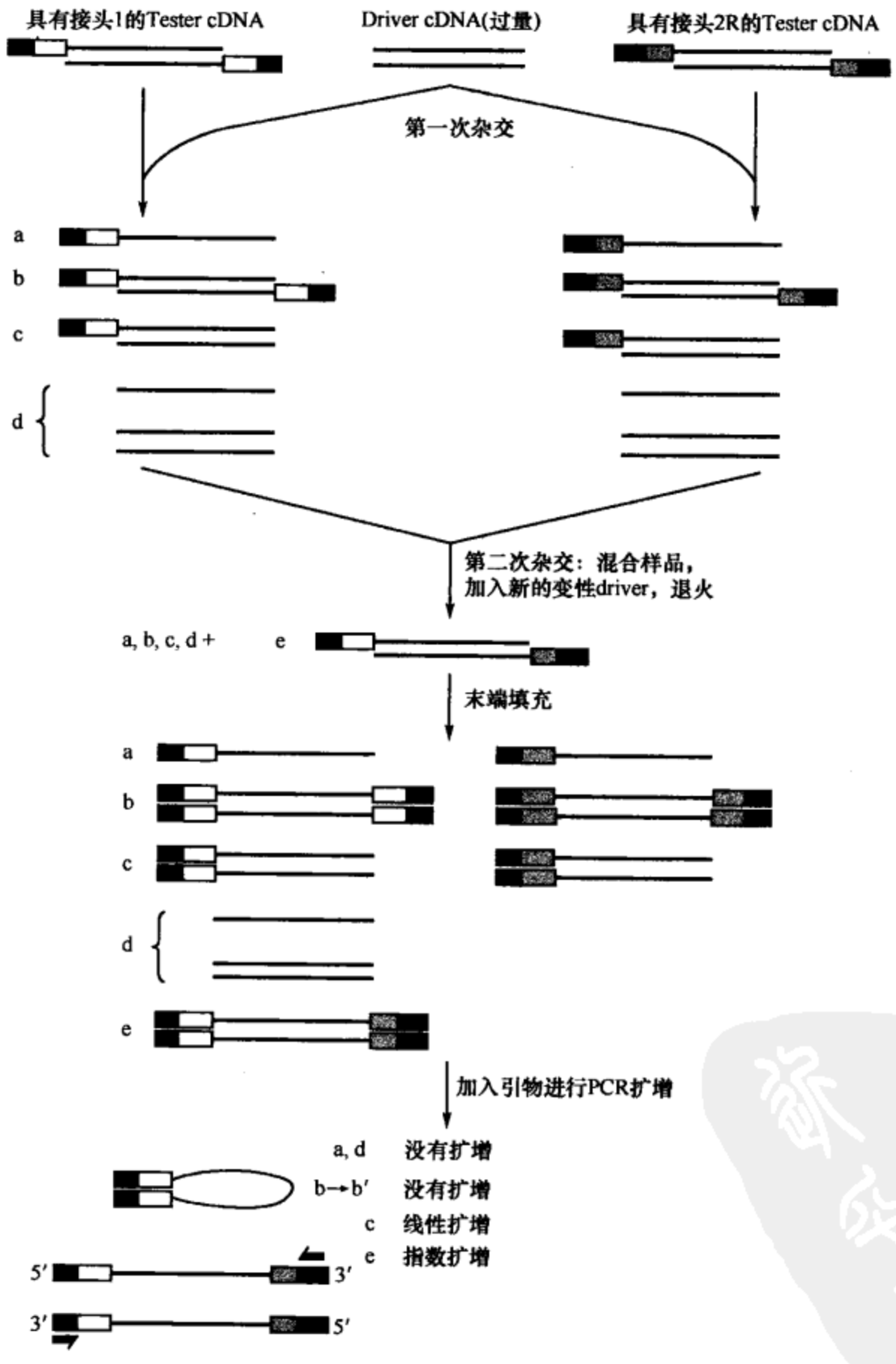


图 11-1　抑制差减杂交技术的基本原理示意图

5.2 SSH 技术的优点

SSH 技术与其他差异显示技术相比具有明显的优越性：

(1) 假阳性率大大降低：与差异显示 RT-PCR，即 DDRT-PCR(mRNA differential display reverse transcription PCR)相比，SSH 的阳性率可达 94%，这是由它的两步杂交和两次 PCR 所保证的。

(2) 高敏感性：在 DDRT-PCR 和 RDA(representational difference analysis)中，低丰度的 mRNA 一般不易被检出，SSH 方法所做的均等化和目标片段的富集，保证了低丰度 mRNA 也可能被检出。

(3) 速度快，效率高：一次 SSH 反应可以同时分离几十或数百个差异表达基因。在高等生物一个细胞中仅有 15%的基因表达，其表达的变化是调控细胞生命活动过程的核心机制，通过比较同一类细胞在不同生理状态下或在不同生长发育阶段的基因表达差异，可为分析生命活动过程提供重要信息。在稻瘟病菌中，SSH 技术也被用来研究附着胞阶段基因表达变化(Asiegbu et al.，2004)。稻瘟病菌具有 11 108 个基因(http://www.broad.mit.edu/ annotation/ fungi/magnaporthe /genome_stats.html)，在每个发育阶段表达的基因仅是其中的一部分。而附着胞是稻瘟病菌的侵染结构，在附着胞阶段表达的基因与稻瘟病菌的致病性密切相关。因此，与突变子文库构建和筛选、cDNA 文库测序及其他差减文库相比，利用 SSH 技术可以比较容易地找到大量参与稻瘟病菌附着胞形成、成熟、穿透、侵入生长等生理过程的基因，包括在附着胞发育、穿透过程中起关键作用的基因。

方案 4　稻瘟病菌附着胞 SSH 差减文库的构建

设备与试剂：

1. Clontech PCR-Select™ cDNA 提取试剂盒　Clontech 公司。
2. 酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)。
3. 氯仿/异戊醇(24∶1)。
4. BD Advantage™ 2 聚合酶混合物　Clontech 公司。
5. 80%乙醇溶液和 96%乙醇溶液。
6. 10mmol/L dNTP 混合物。
7. *Alu* I 限制性内切酶。
8. CM 固体培养基和 CM 液体培养基。
9. LB 培养基(配方见第一章)。
10. Trizol 试剂　MRC 公司。

方法与步骤：

1. RNA 提取和分析

(1) 稻瘟病菌附着胞总 RNA：使用第二章提取的稻瘟病菌附着胞总 RNA(见第二章)。

(2) 稻瘟病菌孢子、菌丝总 RNA 的提取和分析

1) 取 1×10^8 个稻瘟病菌孢子、0.5g 气生菌丝、0.5g 液体培养菌丝混合。

2) 液氮快速冷冻，并碾磨成粉末。

3) 加入 20ml Trizol，室温放置 5min，使其充分裂解。

4) 8 500r/min 离心 5min，弃去沉淀。

5) 按 200μl 氯仿/ml Trizol 加入氯仿，振荡混匀 15s，室温放置 3min。

6) 4℃，8 500r/min 离心 15min。

7) 吸取上层水相，至另一离心管中。

8) 按 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 加入异丙醇混匀，室温放置 10min。

9) 4℃，8 500r/min 离心 10min，弃上清液，RNA 沉于管底。

10) 按 1ml 75%乙醇溶液/ml Trizol 加入 75%乙醇溶液，温和振荡离心管，悬浮沉淀。

11) 4℃，6 500r/min 离心 5min，尽量弃上清液。

12) 冰上晾干 10min。

13) 用适量 H_2O(约 100μl)溶解 RNA 样品。

14) 测 OD 值定量 RNA 浓度。

15) −70℃保存。

16) RNA 甲醛电泳。

2. 长距离 PCR 法合成 cDNA(见 cDNA 文库构建)

(1) cDNA 第一链合成。

(2) 长距离 PCR 法 cDNA 扩增。

(3) 蛋白酶 K 消化和纯化。

3. *Alu* I 限制性内切酶消化

(1) 按表 11-3 的用量将试剂分别加入 2 个离心管：

表 11-3　*Alu* I 限制性内切酶消化体系的组成

	ds 待测 cDNA	ds 驱动 cDNA
ds cDNA	43.5μl	43.5μl
10×*Alu* I 限制性酶缓冲液	5.0μl	5.0μl
Alu I(10U/μl)	1.5μl	1.5μl

(2) 涡旋混匀，短暂离心，37℃温浴 1.5h。

(3) 取 5μl 酶解液放于一边，供最后电泳验证酶解效果使用。

(4) 加入 2.5μl 20×EDTA/糖原液终止反应。

(5) 加入 50μl 酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)。

(6) 涡旋混匀。

(7) 14 000r/min 离心 10min，分相。

(8) 吸取上层水相转移到另一干净的 0.5ml 离心管。

(9) 加入 50μl 氯仿/异戊醇(24∶1)，涡旋混匀。

(10) 14 000r/min 离心 10min，分相。

(11) 吸取上层水相转移到另一干净的 0.5ml 离心管。

(12) 加入 25μl 4mol/L NH_4OAc 和 187.5μl 的 95%乙醇溶液(不要在−20℃贮存)。

(13) 涡旋混匀完全。

(14) 室温 14 000r/min 离心 20min。

(15) 仔细移去上清液。

(16) 用 200μl 80%乙醇溶液轻轻覆盖沉淀洗涤。

(17) 14 000r/min 离心 5min。

(18) 仔细移去上清液。

(19) 空气干燥 5～10min。

(20) 用 5.5μl H_2O 溶解，−20℃保存。

电泳验证第 4 步的酶解液的酶解效果。

4. 接头连接

(1) 用 5μl H_2O 稀释 1μl *Alu* I 酶解的待测 cDNA(试验 cDNA)。

(2) 准备足量的连接用的 Master 混合物：在 0.5ml 离心管中加入表 11-4 所列成分：

(3) 把待测 cDNA 分成 2 管(0.5ml 离心管，待测 1-1 和待测 1-2)，在每一个待测 cDNA 中依次加入表 11-5列成分，吸管混匀。

表 11-4 Master Mix 的体系组成

	1 个反应
无菌水	3μl
5×连接缓冲液	2μl
T4 DNA 连接酶(400U/μl，含 3mmol/L ATP)	1μl

表 11-5 连接反应体系的其他成分用量

管号	1	2
组分	待测 1-1	待测 1-2
稀释的待测 cDNA	2μl	2μl
接头 1(10μmol/L)	2μl	—
接头 2R(10μmol/L)	—	2μl
Master 混合物	6μl	6μl
终体积	10μl	10μl

接头 1 和接头 2R 的序列：

接头 1：5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT -3′

3′-GGCCCGTCCA-5′

接头 2R：5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT -3′

3′-GCCGGCTCCA-5′

(4) 在一新的离心管内，混匀 2μl 待测 1-1 和待测 1-2。混匀后该管为非差减的待测对照 1-C，用于连接效率的测定。大约有 1/3 的 cDNA 分子具有两个不同的接头。

(5) 短暂离心，16℃温浴过夜(培养箱内)。

(6) 加入 1μl EDTA/糖原停止连接。

(7) 72℃温浴 5min，使连接酶失活。

(8) 短暂离心。

(9) 分别移 1μl 的非差减的待测对照 1-C 到新的离心管，并用 H_2O 稀释到 1ml。这些样品作对照 PCR 用。

(10) −20℃保存样品。

(11) 连接效率分析。

5. 第一次差减杂交

(1) 4×杂交缓冲液先在室温放置 15～20min，若有沉淀，则 37℃加热 10min 溶解沉淀。

(2) 在 0.5ml 离心管(tester)中依次加入表 11-6 所列成分：

表 11-6　第一次差减杂交体系组成

成分	杂交样品 1	杂交样品 2
Alu I—酶切 driver cDNA	1.5μl	1.5μl
接头 1—酶切待测 1-1	1.5μl	—
接头 2R—酶切待测 1-2	—	1.5μl
4×杂交缓冲液	1.0μl	1.0μl
终体积	4.0μl	4.0μl

(3) 用一滴矿物油覆盖，稍离心。

(4) 98℃温浴 1.5min(PCR 仪)。

(5) 68℃温浴 8h 左右(PCR 仪)(在 6h～12h 之间)。

6. 第二次差减杂交

(1) 第一次差减杂交结束后，立即进行第二次差减杂交。

(2) 第一次差减杂交产物不要再变性，不能离开 PCR 仪太长时间。

(3) 加入下列成分于一新的无菌离心管：

Driver cDNA	1μl
4×杂交缓冲液	1μl
无菌水	2μl

(4) 取上述 1μl 混合物于 0.5ml 线管，用一滴矿物油覆盖。

(5) 98℃温浴 1.5min(PCR 仪)。

(6) 把上述离心管从 PCR 仪拿出，使用下列步骤同时混合 driver cDNA 和杂交样品 1 和 2，保证只有在新变性的 driver 存在的条件下混匀两个杂交样品。

1) 移液器刻度调为 15μl。

2) 轻轻地把枪头插到杂交样品 2 的矿物油/样品界面以下。

3) 仔细吸取全部样品液(有点矿物油没有关系)。

4) 枪头从离心管中拿出。

5) 吸取一小点空气。

6) 使样品液下有一层空气。

7) 再轻轻地把枪头插到新变性的 driver cDNA 的矿物油/样品界面以下。

8) 仔细吸取全部样品液。

9) 枪头从离心管中拿出。

10) 吸取一小点空气。

11) 使样品液下有一层空气。

12) 把整个混合物转移到含杂交样品 1 的离心管中。

13) 颠倒混匀。

(7) 稍离心。

(8) 68℃温浴过夜(PCR 仪)。

(9) 加 200μl 稀释液到离心管中，吹吸混匀。

(10) 68℃温浴 7min(PCR 仪)。

(11) −20℃保存。

7. PCR 扩增

(1) 准备 PCR 模板。

取 1μl 稀释的 cDNA(差减与未差减的 cDNA)到相应的标记的 PCR 管内。

(2) 准备第一次 PCR 反应用的 Master 混合物,依次混合表 11-7 所列成分。

表 11-7 第一次 PCR 反应体系的组成成分

组分	反应体积(μl)
无菌水	19.5
10×PCR 反应缓冲液	2.5
dNTP 混合物(10mmol/L)	0.5
PCR 引物 1(10μm)	1.0
50×Advantage™ 2 聚合酶	0.5
总体积	24.0

(3) 涡旋混匀,稍离心。

(4) 在第一步的 PCR 管内各加入 24μl 的 Master 混合物。

(5) 覆盖 50μl 矿物油。

(6) 在 PCR 仪内,75℃,5min,延伸接头。

(7) 不要取出 PCR 管,立即在 PCR 仪(GeneAmp 9700)内开始 PCR 循环。

94℃ 25s,1 个循环;

94℃ 10s,68℃ 30s,72℃ 1.5min,27 个循环。

(8) 取 8μl PCR 反应液在 2.0%琼脂糖/EB 胶上电泳分析。

(9) 取 3μl PCR 反应液,加入 27μl H_2O 稀释。

(10) 取 1μl 上述稀释的第一次 PCR 产物混合物到一新的标记的 PCR 管中。

(11) 按表 11-8 的用量准备第二次 PCR 用的 Master 混合物。

表 11-8 第二次 PCR 反应体系的组成成分

组分	反应体积(μl)
无菌水	18.5
10×PCR 反应缓冲液	2.5
巢式 PCR 引物 1(10μm)	1.0
巢式 PCR 引物 2R(10μm)	1.0
dNTP 混合物(10mmol/L)	0.5
50×Advantage™ 2 聚合酶	0.5
总体积	24.0

(12) 混匀,稍离心。

(13) 取 24μl Master 混合物加入第十步的 PCR 管中。

(14) 用 1 滴矿物油覆盖。

(15) 立即进行 PCR 循环。

10～12 个循环:94℃ 10s;68℃ 30s;72℃ 1.5min。

(16) 8μl PCR 反应液在 2.0%琼脂糖/EB 胶上电泳分析。

(17) PCR 反应液－20℃保存。

8. PCR 反应液与 pBS-T 载体(上海生工)的连接与转化

(1) 依次混合表 11-9 所列成分：

表 11-9　PCR 反应产物与 pBS-T 载体的连接体系

组分	反应体系(μl)
PBS-T 载体(25ng/μl)	2
PCR 产物	x
10×PCR 缓冲液	1
T4 DNA 连接酶	3U
ddH_2O	4－x
总体积	10

(2) 混匀，离心。

(3) 4℃连接过夜。

(4) 转化。

9. *E. Coli* DH5α 感受态细胞的制备

(1) 准备 Inoue 转化缓冲液(使用前在冰上预冷)。

1) 0.5mol/L 的 PIPES(pH6.7)溶液的配制：将 15.1g PIPES 溶于 80ml H_2O(Milli-Q)中。

2) 用 5mol/L KOH 调 pH 至 6.7。

3) 最后加纯水。

4) 定容至 100ml。用预先高压灭菌处理的 0.45μm 孔径滤膜过滤除菌。分成小份于－20℃保存。

5) Inoue 转化缓冲液的配制：将表 11-10 所列组分溶于 800ml 纯水中。

6) 然后加 20ml 0.5mol/L 的 PIPES(pH6.7)。

7) 加纯水定容至 1L。

表 11-10　Inoue 转化缓冲液的配方

试剂	需要量/L	终浓度
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10.88g	55 mmol/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.20g	15 mmol/L
KCl	18.65g	250 mmol/L
PIPES(0.5mol/L,pH6.7)	20ml	10 mmol/L
H_2O	加到 1L	

8) 用预先高压灭菌处理的 0.45μm 孔径滤膜过滤除菌。分成小份于－20℃保存。

(2) 挑取一个经 37℃培养 16～20h 平皿上的单菌落(直径 2～3mm)。

(3) 接种至 250ml 三角烧瓶中的 25ml SOB 培养液中

(4) 37℃ 250～300r/min 培养 6～8h。

(5) 晚上约 6 点钟，将上述初始培养液接种于 3 个盛有 250ml SOB 培养液的 1L 三角烧瓶中，第一个加 10ml，第二个加 4ml，第三个加 2ml，于 18℃中速摇床培养过夜。

(6) 次日早上,测量三个培养物的 OD_{600} 值,每 45min 测定一次。

(7) 当培养物的 $OD_{600}=0.55$ 时,将培养瓶置于冰上 10min,弃去另两瓶培养物。

(8) 4℃,3 100r/min 离心 10min 收集菌体。

(9) 倒去培养液,将离心管倒扣在吸水纸上 2min 以吸干剩余液体。

(10) 用 80ml 预冷的 Inoue 转化缓冲液重悬细菌沉淀(轻轻旋转,不要吹吸混匀)。

(11) 4℃,2 500g(或 3 100r/min)离心 10min 收集菌体。

(12) 倒去上层缓冲液,将离心管倒扣在吸水纸上 2min 以吸干剩余液体。

(13) 用 20ml 预冷的 Inoue 转化缓冲液重悬细菌沉淀(轻轻旋转,不要吹吸混匀)。

(14) 加 1.5ml DMSO。轻轻混匀细菌悬液,放于冰上 10min。

(15) 迅速将细菌悬液分装到冷却的无菌 1.5ml 离心管(200μl/管)中,封紧管口。

(16) 没入液氮中快速冰冻感受态细胞。—70℃保存。

10. 感受态细胞的转化

(1) 从冰箱中取 100μl 感受态细胞悬液,放置冰上解冻。

(2) 加入 DNA 连接液(5μl),轻轻摇匀,冰上放置 30min。

(3) 42℃水浴中热击 90s,热击后迅速置于冰上冷却 3～5min。

(4) 向离心管中加入 0.8ml LB 液体培养基(不含 Amp)。

(5) 混匀后 37℃振荡(80r/min)培养 1h,使细菌恢复正常生长状态,并表达质粒编码的抗生素抗性基因(Amp^r)。

(6) 将上述菌液 5 000r/min 离心 30s,倒掉部分培养基,保留约 300μl。

(7) 摇匀后取 100μl 涂布于含 Amp(100μg/μl)的蓝白斑筛选平板上,正面向上放置 0.5h。

(8) 待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿,37℃培养 16～24h。

(9) 挑取白色克隆,LB 液体培养,保存。进行下一步的插入片段验证和测序。

11. X-gal 和 IPTG 直接用于琼脂平板

(1) 在含适当抗生素的预制 90mm 琼脂平板中央滴加 40 μl 3% X-gal 和 7 μl 20% IPTG(150mm 琼脂平板中央滴加 100 μl 3% X-gal 和 20 μl 20% IPTG)。

(2) 用一个无菌的涂布器涂匀。37℃温浴直至全部液体吸收。

(3) 接种需要鉴定的细菌。

(4) 待接种液完全吸收后,37℃颠倒培养 12～19h。

(5) 取出平板于 4℃放置数小时,待蓝色充分显色。

(6) 鉴定重组克隆(白色)。CTAB 法抽提质粒见 cDNA 文库构建。

12. 重组质粒的测序和 EST 序列分析

(1) 重组质粒的插入片段序列直接用 T7 引物,在 ABI 377 DNA 测序仪(Applied Biosystems,USA)上测序。

(2) 原始 EST 序列用 VecScreen 程序(NCBI)分析,去除载体序列(pTriplEx2),然后除去接头序列(接头 1 和接头 2R,Clontech,USA)。得到的稻瘟病菌附着胞 cDNA 差减文库的 EST 序列用 BioEdit 序列(Hall,1999)进行 contig 重组。处理过的 EST 序列先在 Magnaporthe grisea Database(http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ magnaporthe)用 BLAST version 2.2.1(Altshul et al.,1997)进行相似性联配。一旦确定与 EST 序列相对应的 DNA 基因组序列后,对于对应同一基因的 EST 序列(一条或多条)进行归类,并指

定其中最长的一条 EST 序列为代表进行下面的相似性联配。上述处理过的 EST 序列分别在 GenBank 数据库(Blast 2.2.8)、Phytopathogenic Fungi and Oomycete Database in COGEME(http://cogeme.ex.ac.uk/index.html)(Blast 2.2.5)用 BLASTN 和 BLASTX 程序(Altshul et al.,1997)进行相似性联配,并对结果进行分析。

13. SSH 差减文库克隆的 RT-PCR 分析

(1) cDNA 的合成。

(2) 使用前述稻瘟病菌附着胞差减文库的长距离 PCR 法合成的 cDNA(Clontech,USA)。

(3) 引物的设计,根据稻瘟病菌附着胞差减文库的 EST 序列或从稻瘟病菌基因组文库(http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ magnaporthe)获得的相应基因的蛋白编码序列,使用 DNAStar 的 PrimerSelect 程序设计 RT-PCR 引物。

(4) 准备 RT-PCR 反应用的 Master Mix,在每一个标记的 PCR 管内依次混合表 11-11 所列成分。

表 11-11　1RT-PCR 反应体系的组成

组分	附着胞 RT-PCR(μl)	孢子、菌丝 RT-PCR(μl)
无菌水	14.6	14.6
10×PCR 反应缓冲液	2.5	2.5
dNTP 混合物(1mmol/L)	5.0	5.0
$MgCl_2$(25mmol/L)	1.5	1.5
ds cDNA(附着胞)	0.5	—
ds cDNA(菌丝、孢子)	—	0.5
Taq 聚合酶(5U/μl)	0.5	0.5
总体积	24.6	24.6

(5) 涡旋混匀,稍离心。

(6) 在上述每一个标记的 PCR 管内各加入相应的 PCR 引物:

0.2μl 引物 1(F)

0.2μl 引物 2(R)

混匀,稍离心。

(7) 在 PCR 仪(GeneAmp 9700)上立即开始 PCR 循环:

95℃ 1min,1 个循环;

95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s,35 个循环;

72℃ 2min。

(8) 取 5μl PCR 反应液在 1.2%琼脂糖/EB 胶上电泳分析。

6　丝状真菌细胞自噬及其研究方法

细胞内的物质主要有 2 种降解的途径,一种是通过蛋白酶体被降解,另一种就是通过自噬的作用,蛋白酶体主要降解细胞内的短寿命蛋白,而细胞自噬则负责长寿命蛋白和一些细胞器(如线粒体等)的降解利用。细胞自噬是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖

性降解大分子物质的途径，在饥饿条件下，它可以降解细胞内长寿蛋白和细胞器，降解产物再被细胞重新利用。因此，细胞自噬在细胞发育、细胞免疫、组织重塑及对环境适应等方面有着十分重要的作用。

细胞自噬现象（autophagy）最早是于1962年在显微镜下发现的，autophagy一词来源于希腊语，auto指自身，phagy是吃的意思，所以autophagy意为自体吞噬。细胞自噬是细胞内的物质成分被自身溶酶体降解过程的统称，它是真核细胞所特有的，自噬被诱导后，细胞开始在胞浆中形成300～900nm大小的多层液泡，其中包裹着将要被降解的物质，随后液泡与溶酶体结合，液泡中的底物在酸性环境和溶酶体酶的共同作用下被降解，例如蛋白质被分解为氨基酸、核酸被分解为核苷酸等。

6.1 细胞自噬的类型

细胞自噬过程是进化上保守的过程，根据底物进入溶酶体途径的不同，可以将细胞自噬分为3种类型：微自噬（microautophagy）、巨自噬（macroautophagy）和分子伴侣介导的自噬（CMA，chaperone-mediated autophagy）。巨自噬即通常所指的细胞自噬，胞质成分被一种非溶酶体来源的膜所包绕，形成自噬体（autophagosome）或自噬泡，双层膜的小泡-“自噬泡”的形成是这一过程的显著标志，这种自噬体的膜有可能来源于预先形成的小的膜结构（自噬体前体或自噬瓣）。形成的自噬体外膜进而与溶酶体融合成嵌合的双体细胞器，进入溶酶体腔内的自噬体内膜很快就被降解，这使得溶酶体水解酶可以接触内化的底物从而将其降解。在微自噬中也发生相同的包绕过程，但包绕底物的是自身发生内陷的溶酶体膜。由分子伴侣介导的自噬中，可溶性胞质蛋白选择性地结合于溶酶体膜表面的受体，从而调节其向溶酶体腔隙的转运。这种选择性依赖于对底物氨基酸序列中一种靶向信号的识别，通常由胞质内的分子伴侣蛋白完成。形成的伴侣蛋白-底物复合物结合于溶酶体膜的受体上，再由腔内的二级伴侣蛋白对底物进行转运。由于底物、细胞种类及细胞状态等的差异，许多自噬过程也有自己独特的命名，例如macropexophagy、micropexophagy就是分别用来描述通过巨自噬、微自噬而进行的过氧化物酶体的降解。

6.2 细胞自噬的分子机制

细胞自噬是一个进化保守的过程，细胞自噬现象的很多研究都是在酵母中进行的，生物学家们从20世纪90年代开始以酵母为模式来研究细胞自噬，如啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、多形汉逊酵母（*Hansenula polymorpha*）、甲醇酵母（*Pichia pastoris*）等。到目前为止已经发现了30余个参与自噬过程的基因，其中近一半的基因在果蝇、线虫、哺乳动物等多细胞物种中都十分保守。为了统一标准，2003年，Klionsky将这些基因统一命名为ATG（AuTophaGy-related），用来代表自噬基因及其相对应的蛋白质，对这些自噬基因和蛋白的研究阐明了它们之间的相互作用以及它们在自噬过程中的功能。

细胞自噬过程主要是由自噬的诱导、自噬泡的形成、自噬泡与液泡的融合和自噬泡内物质在液泡腔内的降解这几个步骤来完成的，自噬过程的诱导和自噬泡的形成是自噬过程重要的两个环节。目前，人们认为这两个重要环节主要是通过至少17个Atg蛋白协同作用来完成的，它们首先聚集或短暂的停留在自噬结构体PAS（preautophagosomal structure）上。这17个Atg蛋白可被分成5个功能组：①Atg1激酶功能组（Atg1 protein kinase

complex)；②Atg9 膜蛋白循环系统(Atg9 membrane protein recycling system)；③Atg8-磷脂酰乙醇胺(PE)功能组(Atg8 lipid conjugation system；PE，phosphatidylethanolamine)；④Atg12-Atg5 复合体功能组(Atg12-Atg5 protein conjugation system)；⑤磷脂酰肌醇转移蛋白 3(Ptdlns3)-激酶复合体(phosphatidylinositol-3 kinase complex)。5 个功能组相互作用，参与细胞自噬的诱导、自噬泡形成、液泡融合等各个过程。正是在 PAS 上，这 5 个功能组协同作用，共同完成了对自噬泡的加工。而形成的自噬泡被转运到液泡上并发生融合，最后自噬泡内的物质被释放到液泡内腔里完成降解。

6.2.1　自噬的诱导

所有真核细胞中都存在低水平的细胞自噬现象，在细胞受到外界刺激(例如，营养饥饿，供氧不足，群体过剩或者高温)或内部条件发生变化(例如，损坏的或过剩的细胞器和细胞质组件的堆积)等情况下，细胞自噬水平会上调。因此，在胁迫的环境下，为了适应和存活，细胞自噬将被激活。

以酵母为例，酵母中存在一种特殊的选择性蛋白运输途径，即细胞质至液泡运输途径(cytoplasm to vacuole targeting pathway，Cvt 途径)。在正常的营养状态下，细胞启动 Cvt 途径把水解酶等蛋白运输到液泡内腔，但是在饥饿、环境胁迫、雷帕霉素(rapamycin)诱导下，细胞启动自噬过程非选择性的降解胞内的待降解物质。这两个途径的转换是通过一种自噬开关复合物(switching complex)“ATG1 激酶功能组”来实现的。Atg1 是这种复合物的关键组成成分，它是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，在不同的高等真核细胞中，Atg1 在细胞自噬过程中发挥的作用是高度保守的。其另一组分 Atg13 的磷酸化状态受其上游蛋白雷帕霉素靶点蛋白激酶 Tor (target of rapamycin)的负调控。Tor 是氨基酸、ATP 和激素的感受器，是细胞内感知环境变化的最重要信号受体。当细胞受外界饥饿诱导时，*TOR* 基因活性被抑制，ATG13 发生去磷酸化，与 ATG17 相结合形成 ATG13-ATG17 复合体，并激活 Atg1，形成 Atg1-Atg13-Atg17 复合体，诱导自噬发生。该复合体还涉及了 ATG20、ATG24、ATG11、VAC8 等蛋白。然而，还没有证据表明 Cvt 途径存在于除酵母之外的其他高等真核生物中。

6.2.2　自噬泡的形成

双层膜自噬泡的形成是细胞自噬过程的显著标志。在发生自噬的细胞胞浆中出现大量游离的被称为前自噬泡(preautophagosome)的膜性结构，这些膜性结构逐渐发展成为由双层膜结构形成的空泡，其中包裹着蛋白质、变性坏死的细胞器和部分细胞浆，这种双层膜被称为自噬泡 (autophagosome)。然后，自噬泡外膜与溶酶体膜融合，内膜及其包裹的物质进入溶酶体腔，被溶酶体中的酶水解。但是，自噬泡这种双层膜的起源尚不清楚。酿酒酵母中的自噬泡被两个脂质双分子层所围绕，它的直径在 400～900nm 间。自噬泡膜富含脂类，缺乏蛋白质，并且比典型的分泌小泡要大得多，这也意味着自噬体由所需的最小限度的成分组成，最大限度的去装载最终要被降解的材料。

在酵母的研究中发现，ATG8-PE 功能组和 ATG12-ATG5 复合体功能组参与了自噬泡的形成。两个复合体都是 Cvt 泡和自噬泡的结构组分，主要存在于内膜，使孤立的自噬体前体膜连接形成完整的自噬体。两个复合体互相调节，互相影响，在真核生物中作用保守。

其中一个复合体开始于泛素激活酶 E1 的同源体 Atg7。Atg7 的一个重要半胱氨酸被 ATP 激活后，可以与 Atg12 碳端的甘氨酸连接。Atg12 与 Atg5 上第 149 位的赖氨酸通过肽键的连接，被激活的 Atg12 被转移到 E2 泛素激活酶 Atg10 的甘氨酸上，在 PAS 上形成 Atg12-Atg5 复合物。最后，该复合物装配上 Atg16 或 Atg16 四聚物，形成 Atg12-Atg5-Atg16 六聚物复合体，一方面促进自噬体伸展扩张，另一方面促进 Atg8-PE 向自噬泡的聚集。另一个复合体始于半胱氨酸酶 Atg4。Atg4 可以切割 Atg8 碳端的精氨酸，暴露出甘氨酸。Atg7 激活了这个甘氨酸的活性后，将具备了形成硫酯键活性的 Atg8 转移给 Atg3。Atg3 调节 Atg8 与 PE 的连接，形成 Atg8-PE，从而促进自噬体前体膜的聚集和融合。自噬泡形成过程中及过程之后，外膜上的 Atg8-PE 被 Atg4 清除。研究还发现，Atg12-Atg5-Atg16 复合体对 Atg8-PE 作用的稳定性必不可少，但是具体作用机制尚不清楚。

另外，最近研究发现，ATG9 膜蛋白被认为参与了自噬体膜的运输过程。它主要是参与了 ATG 蛋白从成熟自噬体上脱离并循环利用的过程。在 ATG2、ATG18 和 ATG1-ATG13 的作用下，ATG9 从 PAS 膜上脱离，而 ATG11、ATG23、ATG26 则负责让 ATG9 重新回到 PAS 上，ATG9 的荧光定位表明，ATG9 不仅仅定位在自噬体膜上，还定位在其他细胞器上，因此，有理由推测，ATG9 有可能在这些细胞器之间来回穿梭。

磷脂酰肌醇转移蛋白 3-激酶复合体系统中，可以产生位于 PAS 膜上的 PtdIns(3)P 蛋白。该蛋白可以将其下游自噬相关蛋白，如 ATG18、ATG20、ATG21 和 ATG24 等，定位到 PAS 上。

6.2.3 自噬体与溶酶体/液泡的融合

自噬体以及 Cvt 小泡和液泡的融合所需的装置包含 SNARE 蛋白 Vam3、Vam7、Vti1 与 Ykt6；NSF、SNAP 与 GDI 同源物 Sec17、Sec18，Sec19；rab 蛋白 Ypt7；和 C 组 Vps/HOPS 复合物的成员。首先，外层膜与液泡膜融合，接着单层膜的自噬小体被释放到液泡内腔里，随后在 Prel 和 Pep4 蛋白酶及 ATG15 的作用下，自噬小体破裂，其中的待降解物质被释放并最终被降解。自噬泡的溶解被认为依赖于液泡腔的酸性 pH 和蛋白酶 B；然而，蛋白酶 B 的功能可能是激活直接作用于分解过程的液泡酶原。降解后的物质可以被细胞重新利用，参与细胞物质的再循环过程。

6.3 细胞自噬的功能

早在 1966 年 de Duve(1974 诺贝尔奖获得者和溶酶体的发现者)和 Robert Wattiaux 提到，先生儿的肾、肺、肠，胎儿的十二指肠，变形虫唾液腺，衰退的苗勒管，两栖动物红细胞、角质化的皮肤，和家鼠阉割后的前列腺等细胞在分化或其他诱导变化发生过程中重塑时，细胞自噬得到增强。然而直到目前为止，关于自噬在分化和发育中作用的研究，很大一部分都被限定在形态学相关性的研究上，比较缺乏细胞自噬在分化和发育中机制作用的确切证据。

随着人们对细胞自噬过程日益深入的研究，对于细胞自噬功能的认识不断深入。最初在酿酒酵母中，细胞自噬被作为一种营养缺乏条件下的耐受性机制而被广泛研究。最近的研究表明，在富集营养生长条件下，酵母中的细胞自噬与液泡水解酶转运到液泡相关。在哺乳细胞中，细胞自噬对蛋白聚集体的清理和抵御病毒或细菌的入侵有一定的作用。此外，细胞自噬在植物中有抗衰老的作用。细胞自噬系统的损坏会产生高等真核生物适应性

不良，甚至会导致致命的病态效应，如蛋白折叠障碍，神经退化症和新生儿的夭折等。细胞自噬过程是酵母、黏菌、线虫和果蝇发育与分化所必须的；更确切地说，细胞自噬是伴随着大量细胞组件降解的细胞重塑所必需的过程。

6.4　细胞自噬的观察

6.4.1　显微镜观察

迄今为止，电子显微镜是研究细胞自噬的唯一可信赖方法，细胞的自噬现象最初也是通过电子显微镜发现的。在电子显微镜下，自噬体由包裹未吞噬降解的胞浆物质、细胞器的双层膜结构组成；而自噬溶酶体由单层膜结构组成，其中包裹着处于不同降解阶段的胞浆成分。由于有时很难严格区分自噬体和自噬溶酶体，二者经常统称为“自噬泡”。通过电镜可对细胞的自噬活性进行定量。自噬泡占胞浆总面积或体积的比例是目前通过电镜对细胞自噬活性进行定量的唯一方法。在对酵母细胞自噬的研究中，利用囊泡蛋白酶缺陷细胞系或用蛋白酶抑制剂 PMSF 处理抑制自噬体的降解，仅通过光学显微镜就可观察到囊泡中未降解的自噬体。

6.4.2　Monodansylcadaverine(MDC)染色

Monodansylcadaverine (MDC) 是一种荧光染料，被用作自噬泡的示踪剂。自噬体形成依赖的第 2 个泛素样蛋白结合系统(Atg8)位于自噬囊泡膜上，可与 MDC 特异结合，因此，通过荧光染色，MDC 可被细胞吸收并选择性地聚集于自噬囊泡，在荧光显微镜下可见核周区域阳性显色，呈点状结构，故可利用这种方法对自噬进行定量检测。只有当溶酶体内容物为酸性时，才可获得 MDC 阳性染色信号；对溶酶体内容物的中和可导致 MDC 染色立即消失或细胞溶酶体对 MDC 摄取的缺乏。然而，自噬体通常情况下并不一定是酸性的。尽管某些 MDC 阳性点状结构的确代表自噬溶酶体，某些情况下 MDC 阳性点状结构的数量还与细胞的自噬活性相关，MDC 并不是自噬泡的特异标志物。利用 MDC 染色作为细胞自噬活性的指标应该结合其他实验证据。

6.4.3　GFP-LC3 定位

在哺乳动物细胞中，LC3 是酵母 *ATG8*(*Aut7/Apg8*) 基因的同源物，定位于前自噬泡和自噬泡膜表面，是细胞自噬泡膜的通用标记物。通过构建 LC3 与绿色荧光蛋白(GFP)或其衍生物的融合蛋白，借助于荧光显微镜，可以很方便的观察到 LC3 在细胞中的定位。与自噬体相比，自噬溶酶体表面的 LC3 要少得多，因此，其荧光信号也要少得多或消失。如果自噬体的直径大于 1μm，在荧光显微镜下可见其环状结构。自噬体的形状取决于细胞类型。有证据表明，GFP-LC3 的超表达并不影响细胞内源性细胞自噬活性。通过建立 GFP-LC3 转基因小鼠，其体内细胞自噬的活性可通过制作冰冻切片并在荧光显微镜下观察直接检测。实验结果表明，在营养缺乏情况下，几乎所有组织都可观察到细胞的自噬，某些组织也可自发发生自噬现象。由于大多数 GFP-LC3 代表的是细胞中游离囊泡和自噬泡，而不是自噬溶酶体，因此，严格来讲，GFP-LC3 点状结构的出现并不一定代表细胞的自噬性降解活性。在某些情况下，需要同时监测溶酶体的数量和定位。GFP-LC3 点状结构的数量还与

不同组织细胞中自噬体的半衰期有关。最近，有报道以 MDC、LC3、CD63 等为指标结合荧光显微镜方法在活细胞中动态研究了自噬过程。

6.4.4 LC3-Ⅰ到 LC3-Ⅱ的转化

如上所述，细胞中新合成的 LC3 经过加工，成为胞浆可溶性 LC3-Ⅰ，后者经泛素样加工修饰过程，与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺(PE)结合，称为 LC3-Ⅱ。LC3-Ⅱ含量的多少在某种程度上反映了细胞的自噬活性。在免疫印记试验中，LC3-Ⅱ较 LC3-Ⅰ更加敏感一些。因此，在营养丰富情况下，有时 LC3-Ⅱ的信号比 LC3-Ⅰ还要强一些。通过免疫印记方法对哺乳动物细胞的 autophagy 活性进行定量检测非常方便。

6.4.5 Beclin 1 的表达

哺乳动物中 Beclin 1 是酵母 *Apg6/Vps30* 基因的同源物，酵母双杂交筛选试验证明 Beclin 1 是 Bcl-2 的一个相互作用蛋白。人乳腺癌细胞 MCF-7 的 Beclin 1 表达减少或消失，超表达 Beclin 1 可加强血清和氨基酸撤除诱导的细胞自噬，说明 Beclin 1 是细胞自噬重要的正调节因子。在应用 Beclin 1 基因敲除突变体研究小鼠的胚胎干细胞发育中，Beclin 1−/−小鼠死于胚胎早期，Beclin 1+/−小鼠虽然表型正常，但其自发性肿瘤发生的频率却很高，说明 Beclin 1 是一个重要的肿瘤抑制基因，其杂合性缺失是细胞发生恶性转化的原因之一。近一步的研究指出，Beclin 1−/−小鼠 Autophagy 缺陷，细胞凋亡(apoptosis)正常，说明 Beclin 1 是细胞自噬的调控基因。因此，通过免疫印记检测 Beclin 1 的表达水平，结合其他生化指标，可对细胞的 autophagy 活性进行动态监测和判断。

6.4.6 特异抑制剂

3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine，3-MA)是磷脂酰肌醇 3 激酶的抑制剂，可特异性阻断细胞自噬中自噬泡与溶酶体的融合，被广泛用作 autophagy 的抑制剂。另外，渥曼青霉素(Wortmannin)、LY29400 和巴佛洛霉素 A1(Bafilomycin A1)也可用作细胞自噬的抑制剂。

6.5 稻瘟病菌与细胞自噬

细胞自噬过程在进化上的高保守性，酵母细胞自噬分子机制的研究为高等真核生物细胞自噬生物学功能的识别提供了基础。稻瘟病是一种毁灭性病害，给全世界的水稻生产带来巨大威胁。稻瘟病菌具有遗传上的多样性和复杂性，在致病性方面表现多变性，这也是稻瘟病难防难治的原因之一。从分子水平上阐明稻瘟病菌致病过程及致病性变异的机制，对于稻瘟病的防治具有重大意义。经世界上研究稻瘟病菌的几个重要实验室的共同努力，2002 年 10 月完成了稻瘟病菌 70-15 菌株全序列草图的绘制。稻瘟病菌的研究已逐渐成为重要经济作物和病原真菌相互作用的研究模式。

2006 年，英国 N. J. Talbot 实验室研究发现，细胞自噬过程影响稻瘟病菌致病过程，细胞自噬相关基因 *MgATG8* 缺失，导致稻瘟病菌致病性丧失。2007 年，林福呈实验室在差减文库中分离到了细胞自噬相关基因 *MgATG1*，该基因缺失，稻瘟病菌细胞自噬过程被阻断，稻瘟病菌的产孢能力下降，孢子萌发率下降，附着胞膨压下降，侵染寄主的能力显著下降，最终致病性丧失。

细胞自噬是真核生物特有的生命现象，贯穿于正常细胞生长发育和生理病理的整个过程。细胞自噬基因的发现使人们从分子水平认识了自噬，但总体来说，我们对细胞自噬的认识还只是处于初级阶段，尤其在较高等的真核生物中，对自噬泡双层膜的起源、参与分子、信号转导、其对细胞生存的影响、病理生理学意义等方面的研究了解尚不全面，还有待进一步深入。细胞自噬过程与稻瘟病菌的致病性密切相关，其作用机制还有待于进一步的深入研究。

方案 5　稻瘟病菌中细胞自噬研究方法

真菌中细胞自噬研究方法主要有显微镜观察法、MDC 染色观察法和电子显微镜观察法，其实验步骤如下：

1. 显微镜观察

(1) 试剂

1) CM 培养基：见第三章方案 8。

2) MM-N 培养基

KCl	0.52g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.52g
KH_2PO_4	1.52g
微量元素溶液	1ml
D-葡萄糖	10g
维生素溶液	1ml
1mol/L NaOH 调 pH	至 6.5
加 ddH_2O 至	1 000ml

微量元素溶液、维生素溶液配方见第三章方案 8。

3) 1mol/L PMSF 储存液：用 DMSO 溶解 PMSF 固体。

(2) 方法与步骤

1) 稻瘟病菌在液体 CM 培养基中培养 24h，用无菌水将菌丝洗干净，转移到 MM-N 中（含有 2mmol/L PMSF），诱导 4h；经过 PMSF 诱导后，自噬泡在液泡中积累。

2) 挑取菌丝，在显微镜下观察细胞自噬现象。

2. MDC 染色观察

(1) 试剂：CM 培养基；MM-N 培养基；MDC 母液：pH 7.0 磷酸缓冲液配制成浓度 5 mmol/L。

(2) 方法与步骤

1) 稻瘟病菌在液体 CM 培养基中培养 24h，用无菌水将菌丝洗干净，转移到 MM-N 中（含有 2mmol/L PMSF），诱导 4h；

2) 用 0.05 mmol/L MDC 溶液，37℃避光染色 15min；

3) 用 PBS 缓冲液洗涤，显微镜观察；

4) 用荧光显微镜进行观察拍照，激发波长 350nm，发射波长 320 到 520 nm。

3. 电子显微镜观察

(1) 试剂：CM 培养基，MM-N 培养基，2.5%戊二醛溶液，pH＝7.0 的磷酸缓冲液，1%锇酸，50%、70%、80%、90%和 95% 5 种浓度的乙醇，丙酮，包埋剂。

(2) 方法与步骤

1) 稻瘟病菌在液体 CM 培养 24h，用无菌水将菌丝洗干净，转移到 MM-N 中(含有 2mmol/L PMSF)，诱导 4h；用 4%琼脂包埋样品。

2) 在 2.5%戊二醛溶液中 4℃固定过夜。

3) 倒掉固定液，用 0.1mol/L，pH=7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品 3 次，每次 15min。

4) 用 1%锇酸溶液固定样品 1～2h。

5) 倒掉固定液，用 0.1mol/L，pH=7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品 3 次，每次 15min。

6) 用梯度浓度(包括 50%、70%、80%、90%和 95% 5 种浓度)的乙醇溶液对样品进行脱水处理，每种浓度处理 15min，再用 100%的乙醇处理一次，每次 20min；最后过渡到纯丙酮处理 20min。

7) 用包埋剂与丙酮的混合液(V/V=1/1)处理样品 1h。

8) 用包埋剂与丙酮的混合液(V/V=3/1)处理样品 3h。

9) 纯包埋剂处理样品过夜；将经过渗透处理的样品包埋起来，70℃加热过夜，即得到包埋好的样品。样品在 Reichert 超薄切片机中切片，获得 70～90nm 的切片，该切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50%乙醇饱和溶液各染色 15min，即可在日本 JEOL 公司的 JEM-1230 型透射电镜中观察。

方案 6　稻瘟病菌细胞自噬研究中的其他相关显微观察

在稻瘟病菌细胞自噬研究中，还经常要观察侵染过程、脂质体变化和糖原代谢过程，主要实验步骤如下：

1. 稻瘟菌菌侵染过程的组织病理学观察

(1) 试剂与溶液：棉蓝乳酚液(乳酚油配方为：乳酸 20ml、苯酚 20ml、20%甘油 40ml、蒸馏水 20ml。乳酚油中加入 0.05%～0.1%棉蓝)；固定透明液(乳酚油：95%乙醇=1:2)

(2) 方法与步骤

1) 准备稻瘟病菌的分生孢子悬浮液，浓度为 10^4～10^5 孢子/ml。

2) 20μl/滴接种于生长 8 天的大麦叶片。

3) 24h、48h、72h、96h 各时间段取接种过孢子的叶片，甲醇中脱色至叶片透明。

4) 用固定透明液固定样品 10min。

5) 棉蓝乳酚液染色 10min 后，用固定透明液脱色。

6) 显微镜观察附着胞穿透情况。

2. 脂质体的观察

(1) 试剂

50 mmol/L 马来酸马来酸缓冲液(Tris/maleate buffer, pH 7.5)。

20 mg/ml 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone，PVP)。

2.5μg/ml 尼罗红染液(Nile red oxazone)，用丙酮配制。

(2) 方法与步骤

1) 收集新鲜的孢子，接种于洋葱表皮或者塑料盖玻片上培养。

2) 当孢子萌发后，在适当的发育阶段，将要研究的组织，如孢子、芽管或附着胞，浸在染色液中数秒钟，用荧光显微镜观察。

3. 糖原染色

(1) 试剂：1ml ddH_2O 中包括 60mg KI 和 10mg I_2。

(2) 方法与步骤：新鲜收集的孢子，接种于洋葱表皮或者塑料盖玻片上的孢子、附着胞，浸在染色液中数秒钟，显微镜下观察。很快会看到黄褐色糖原沉积物，如果没有颜色变化，说明没有糖原积累。

6.6　双分子荧光互补技术在细胞自噬及蛋白互作研究中的应用

双分子荧光互补(biomolecular fluorescence complementation，BiFC)技术，是由 Hu 等在 2002 年最先报道的一种直观、快速地判断目标蛋白在活细胞中的定位和相互作用的新技术。该技术巧妙地将荧光蛋白分子的两个互补片段分别与目标蛋白融合表达，如果荧光蛋白活性恢复则表明两个目标蛋白发生了相互作用。目前，该技术已经用于转录因子，G 蛋白 βγ 亚基的二聚体形式，不同蛋白质间产生相互作用强弱的比较及蛋白泛素化等方面的研究工作上。

绿色荧光蛋白(GFP)来源于水母(*Aequorea victoria*)，分子质量约为 27kDa，能在各种细胞中表达，受到激发时不需要任何辅助因子就能在活体中发出绿色荧光。GFP 作为一种研究基因表达和蛋白质细胞定位的活体遗传标记，在各种类型的细胞研究中得到了广泛应用。GFP 的一些定点突变能明显改变其波长性质，其突变体可产生多色荧光。如 GFP66 位的酪氨酸突变为色氨酸后成为青色荧光蛋白(cyan fluorescence protein，CFP)，203 位的苏氨酸突变为酪氨酸后成为黄色荧光蛋白(yellow fluorescence protein，YFP)，145 位的酪氨酸突变为苯丙氨酸后成为蓝色荧光蛋白(blue fluorescence protein，BFP)。

GFP 家族还有一重要性质一循环排列。GFP、YFP、CFP 和 BFP 都是由 238 个氨基酸组成的单体蛋白质，荧光的产生主要归功于分子内第 65、66、67 位丝氨酸、酪氨酸、甘氨酸自环化形成生色团的功效。而该过程大约在蛋白质形成约 4 h 完成。晶体结构显示，蛋白质中央是一圆桶形结构，有 11 个围绕中心 α 螺旋的反向平行的 β 折叠组成。荧光基团的形成就是从这个螺旋开始的，桶的顶部由 3 个短的垂直片段覆盖，底部由一个短的垂直片段覆盖，对荧光活性很重要的生色团则位于大腔内。

BiFC 技术正是利用该荧光蛋白家族的这一特性，在环结构的特异位点将荧光蛋白切成 N 端片段和 C 端片段两部分，再由一小段氨基酸序列分别与目标蛋白连接。重组好的基因构建入载体，共转化细胞。两段重组基因在细胞中融合表达，若目标蛋白间存在相互作用，通过 linker 牵引荧光蛋白的 N 端片段和 C 端片段就能够相互靠近，进而形成荧光蛋白生色团重新发出荧光。因此，在显微镜下检测是否有荧光产生，就可以推断出两目标蛋白是否发生了相互作用。

质粒的构建是整个实验的关键步骤：①首先经 PCR 扩增得到 YFP 1～154 位氨基酸的 N 端片段 YFPN 和 155～238 位氨基酸的 C 端片段 YFPC，并都引入上游的 *Not*I 酶切位点和下游的 *Spe*I 酶切位点。同时上游引物中还分别引入编码 RSIAT 和 RPACKIPNDLKQKVMNH 的连接序列 linker。②目标蛋白的两端也通过 PCR 引入 *Nco*I 的酶切位点。③通过 linker 连接起荧光蛋白片段和目的蛋白基因，再将重组好的基因接入真核表达载体的多克隆位点。④将构建好的质粒共转染细胞。

方案 7　双分子荧光互补技术

下面以稻瘟病菌 *MgATG4* 和 *MgATG8* 互作为例介绍相关的实验步骤：

1. 载体构建

(1) ATG4-YFPN 载体构建：以 pEYFP 质粒为模板，以 YFPNF 和 YFPNR 引物扩增 YFP N 端编码 1～154 氨基酸的 DNA 序列，用 *Age*I 和 *Not*I 酶切后连接到载体 pATG4-GFP 的 *Age*I/*Not*I 位点上，构建 MgATG4 与 YFPN 的融合表达载体 pATG4-YFPN (MgATG4(p)-ATG4-YFPN)。

(2) YFPC-ATG8 载体构建：用引物 YFPCF(引入 *Bam*HI 位点)和 YFPCR(引入 *Age*I 位点)扩增 *YFP* 基因的 C 段序列(155-238)，经 *Bam*HI 和 *Age*I 酶切后插入到 MgATG4 (p)-ATG4- GFP 质粒的 *Bam*HI/*Age*I 位点上得到 MgATG4(p)-YFPC-GFP 质粒。用 MgATG8 cDNA P1 引物(引入 *Age*I 位点)和 MgATG8 cDNA P2 引物(引入 *Not*I 位点)，以 24 h 成熟附着胞文库为模板扩增 *MgATG8* 基因序列连接到 pUCm-T 载体上。用 *Age*I/*Not*I 酶切后将 *MgATG8* 基因插入到 MgATG4(p)-YFPC-GFP 质粒的 *Age*I/*Not*I 位点上，得到 MgATG4(p)-YFPC-ATG8 质粒。用引物 BARP1(引入 *Not*I 位点)和 BARP2(引入 *Spe*I 位点)扩增草胺磷抗性基因 BAR，经 *Not*I 和 *Spe*I 酶切后插入到 MgATG4(p)-YFPC-ATG8 质粒的 *Not*I/*Spe*I 位点上，替换掉潮霉素基因 *HPH*，引入草胺磷抗性基因 *BAR*，得到载体 pYFPC-ATG8-BAR。

(3) 阴性对照载体构建：采用 *Nco*I 酶切 ATG4-YFPN 质粒，去掉 *MgATG4* 基因内部的 570 bp(5-575，共 190 个氨基酸)，然后载体自连，得到 ATG4Δ-YFPN 质粒。

2. 原生质体共转化载体经 *Eco*RV 酶切后，ATG4-YFPN 和 ATG8-YFPC；ATG4Δ-YFPN 和 ATG8-YFPC 分别共转化稻瘟病菌原生质体，用潮霉素和草胺磷两种抗生素共同筛选。

3. 表达载体的共转化及转化子筛选　构建好的 BiFC 载体 MgATG4(p)-ATG4-YFPN (ATG4-YFPN)及阴性对照 MgATG4(p)-ATG4Δ-YFP(ATG4Δ-YFPN)用 *Eco*RV 线性化，MgATG4(p)-YFPC- ATG8(YFPC-ATG8)用 *Xba*I 线性化，共转化稻瘟病菌野生型 Guy11 原生质体，采用潮霉素(200μg/ml)和草胺磷(300μg/ml)2 种抗生素进行筛选。约一周后挑取转化子在含有潮霉素(200μg/ml)和草胺磷(300μg/ml)2 种抗生素的 CM 平板上再筛选一次。

4. YFP 荧光的检测　取单孢分离的转化子菌株 BY1-7 接种在 CM 平板上，收集孢子并诱导孢子萌发和附着胞形成并观察孢子、菌丝、附着胞的荧光的有无；取单孢分离的转化子菌株接种在液体 CM 培养基里，并进行饥饿诱导，观察菌丝荧光情况。同时设置阴性对照转化子 BY2-1 实验。

在孢子、营养菌丝中均没有检测到 YFP 荧光(图 11-2A、B)。将 BY-7 的分生孢子以 1×10^5 个/ml 接种到洋葱表皮上面，分别培养 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、32 h 并在显微镜下检测荧光。2 h 时很多芽管开始形成钩状体并开始形成附着胞，但在芽管中并没有检测到 YFP 荧光(图 11-2C)，表明在附着胞形成初期没有检测到 MgATG4 与 MgATG8 之间的相互作用。在接下来的 4 h、8 h、12 h、24 h、32 h 均未检测到荧光信号或荧光信号非常弱，难与洋葱表皮的自发荧光相区分(图 11-2D、E、F)，对照转化子也未检测到 YFP 荧光。由于饥

饿可以诱导细胞自噬发生，接下来将CM液体培养基中的菌丝用无菌水洗净，转接到MM-N培养基中饥饿诱导4 h，在荧光显微镜下观察，结果检测到YFP荧光信号（图11-2G），而对照转化子BY2-1在饥饿诱导的条件下也未检测到荧光（图11-2H），表明在饥饿诱导的情况下检测到了MgATG4与MgATG8之间的相互作用，因此饥饿诱导可加强MgATG4与MgATG8之间的相互作用。

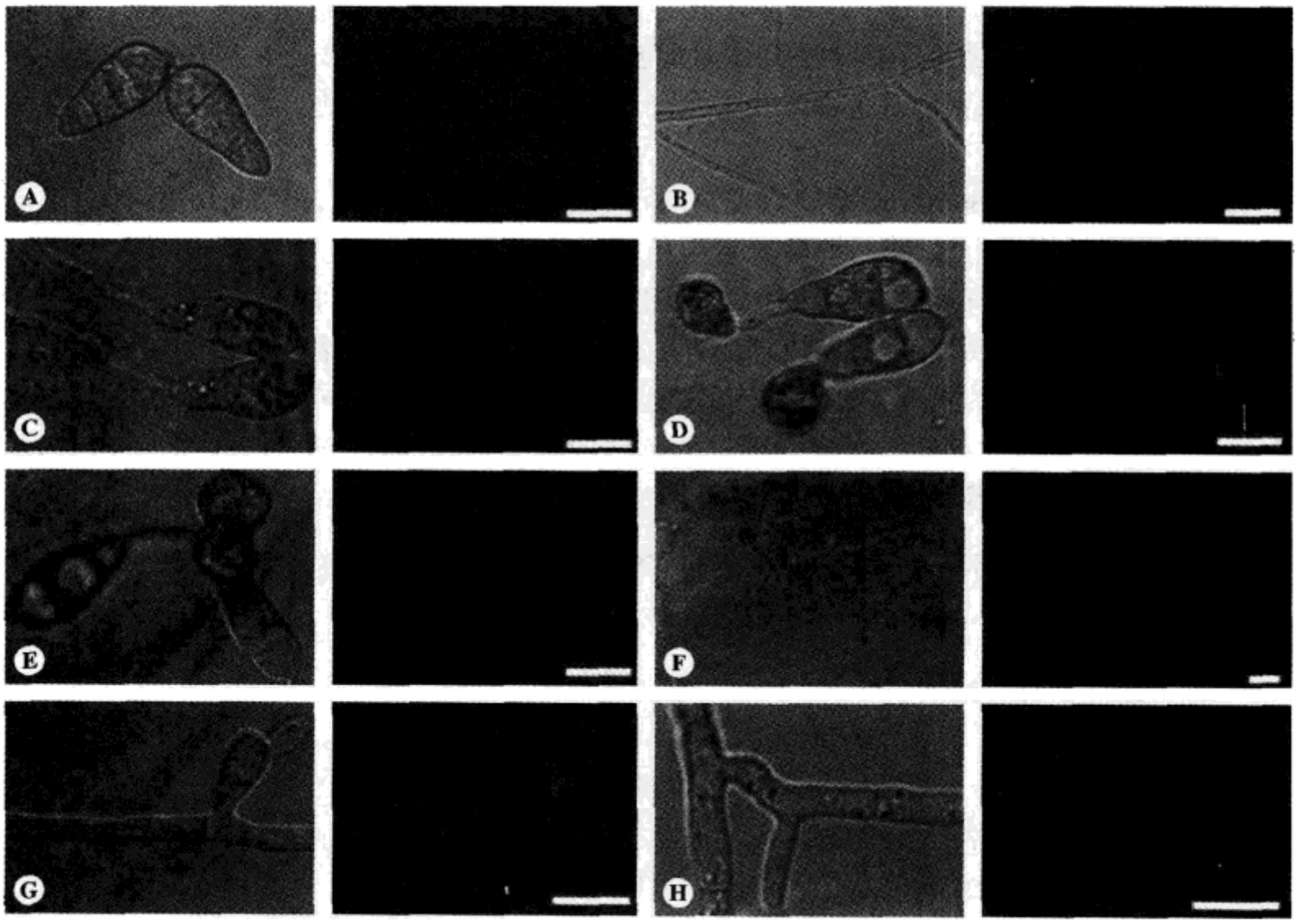


图11-2　MgATG4和MgATG8体内互作检测结果

标尺＝10μm

引物序列：

YFPNF：5′- GGACCGGTGCGCTCCATCGCCACGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT-3′

YFPNR：5′- GGGCGGCCGCTTAGGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGT-3′

YFPCF：5′- GGGGATCCCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCA-3′

YFPCR：5′-CCACCGGTGTGGTTCATGACCTTCTGTTTCAGGTCGTTCGGGATCTTGCAGGCCGGGCGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3′

MGATG8CDNA P1：5′- GGACCGGTATGCGCTCCAAGTTCAAGGACG-3′

MGATG8CDNA P2：5′- GGGCGGCCGCTCACTCGACTTCCTCAAACAGG-3′

ATG8 PROP1：5′- GGTCTAGAAACCCGTATCGTGCTGCTATGCTAA-3′

ATG8 PROP2：5′- GGGGATCCATGGCGGCGGTTGATTGAGACTTG-3′

ATG4 PROP1：5′- GGTCTAGACGCCCACCGTGTCGAGCATAAATA-3′

ATG4 PROP2：5′- CCGGATCCCCAGCCACGGCCGAATCCAT-3′
HPH1：5′- GGGCGGCCGCGGAGGTCAACACATCAATG-3′
HPH2：5′-GGACTAGTCTACTCTATTCCTTTGCCCTCG-3′

6.7 蛋白质印迹是研究基因互作的重要方法

蛋白质印迹(Western Blot)，它是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法。其基本原理是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色，通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中的表达情况的信息。

Western 杂交与 Southern 印迹杂交或 Northern 杂交方法类似，但 Western 杂交采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳，被检测物是蛋白质，“探针”是抗体，“显色”用标记的二抗。经过 PAGE 分离的蛋白质样品，转移到固相载体[例如硝酸纤维素膜(NC 膜)]上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的抗体起免疫反应，再与酶或同位素标记的第二抗体起反应，经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。该技术也广泛应用于检测蛋白表达的水平。

方案 8 蛋白质电泳(Tricine-SDS-PAGE)及蛋白质印迹杂交

1. 试剂溶液

(1) AB-3 储备胶溶液(49.5% Acr，3% Bis)

丙烯酰胺(Acr)	48.0g
亚甲双丙烯酰胺(Bis)	1.5g

混匀后 ddH_2O，37℃溶解，定容至 100ml，过滤，棕色瓶 4℃保存。

(2) AB-6 储备胶溶液(49.5% Acr，6% Bis)

丙烯酰胺(Acr)	46.5g
亚甲双丙烯酰胺(Bis)	3.0g

混匀后 ddH_2O，37℃溶解，定容至 100ml，过滤，棕色瓶 4℃保存。

(3) 正极缓冲液(0.2mol/L Tris-HCl pH 8.9)：Tris 24.22g 加 ddH_2O 溶解，浓盐酸调 pH 8.9，定容至 1 L。

(4) 负极缓冲液(0.1mol/L Tris-HCl，0.1mol/L Tricine，0.1% SDS)：Tris 12.1g，19.2g Tricine，1g SDS 加 ddH_2O 溶解，定容至 1 L。

(5) 凝胶缓冲液(gel buffer，G-B，3×)

Tris	36.342g
SDS	0.3g
ddH_2O	定容到 100ml

调 pH=8.45，过滤 4℃保存。

(6) 10%过硫酸铵(AP)：0.1g AP 加 ddH_2O 至 1.0ml，4℃保存，要在 1 周内使用，最好新鲜配制。

(7) 2×加样缓冲液(2×SDS 加样缓冲液)

0.5mol/L Tris-HCl(pH 6.8)	2ml
10%SDS	4ml
β-巯基乙醇	1ml
甘油	2ml
1%溴酚蓝	1ml

置4℃避光保存。

(8) TEMED:注意室温较低时TEMED量可加倍,最后灌胶之前再用。

(9) 转膜缓冲液(湿转)

Tris	3.0g
甘氨酸	14.4g
M-OH	200ml

加去离子水至1000ml。

(10) 0.01mol/L PBS (pH 7.4)

NaCl	8.5g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.9011g
$NH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.24g

加ddH_2O定容至1000ml。

(11) 封闭液

1×PBS	200ml
脱脂奶粉	10g
叠氮钠	0.04g
Tween 20	0.1g

(12) 漂洗液(PBST):含0.05% Tween 20的PBS溶液,每1000ml PBS溶液中加0.5ml Tween 20。

(13) 水饱和正丁醇

正丁醇	50ml
ddH_2O	5ml

加入瓶中震荡,使结合,存于室温,用时取上面一相加在凝胶上面。

(14) 考马斯亮蓝染色法试剂

染色液:90ml甲醇/水(1∶1,*V*/*V*)和10ml冰乙酸的混合液中溶解R250考马斯亮蓝0.25g,用Whatman 1号滤纸过滤染液以去除颗粒状物质。

(15) 脱色液:90ml甲醇/水(1∶1,*V*/*V*)和10ml冰乙酸的混合液。

(16) 丽春红S染色法试剂

乙酸	2%
丽春红的水溶液	0.5%

(17) PMSF:在溶液中不稳定,应在临用前从储存液中现加于裂解液中。一旦眼睛或皮肤接触了PMSF,应立即用大量的水冲洗。凡被PMSF污染的衣物应予丢弃。PMSF通常配成10 mmol/L浓度储液(1.74或17.4 mg/ml溶于异丙醇中)保存于−20℃。

(18) His抗体,IgG_1;碱性磷酸酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)。

(19) 碱性磷酸酶缓冲溶液:100 mmol/L NaCl,5 mmol/L $MgCl_2$,100 mmol/L Tris-HCl (pH 9.5)。

(20) BCIP/NBT:NBT 在 10ml 70%二甲基甲酰胺中溶解 0.5g NBT;BCIP 在10ml 100%二甲基甲酰胺中溶解 0.5g BCIP;取 66 μl NBT 溶液与 10ml 碱性磷酸酶缓冲液混匀,加入 33 μl BCIP 溶液。这一生色底物混合液应在 30min 内使用。

(21) 终止反应液:200μl 0.5mol/L EDTA(pH8.0)和 50ml PBS。

2. 方法与步骤

(1) 制备凝胶:按下列配方制备分离胶和积层胶。

试剂	4% 积层胶(3ml)	10% 分离胶(8ml)
AB-3	0.25ml	—
AB-6	—	1.6ml
3×凝胶缓冲液	0.75ml	2.67ml
甘油	—	0.63ml
ddH_2O	2ml	3.1ml
10%APS	22.5 μl	40 μl
TEMED	2.25 μl	4 μl

先注入分离胶,待分离胶凝固后(0.5～1 h),注入积层胶;待积层胶凝固后(0.5～1 h)可准备电泳。

(2) 准备样品[TCA(Trichloroacetic acid)沉淀蛋白方法]

1) 菌液 14 000r/min 离心 5min,收集表达上清;

2) 取 500～1000 μl 上清于 EP 管中,加入 1/9 体积的 100%TCA,颠倒 10 次混匀;

3) 样品置于冰浴中大于 0.5 h,过夜效果更好;

4) 14 000r/min 离心 10～20min,可见有棕黑色沉淀,倒掉上清,将 EP 管倒扣在吸水纸上轻轻控几下,除去残余在管口的液体;

5) 加入 500 μl 冰冷的丙酮,用手指轻弹 EP 管,洗去管底和管壁残余的 TCA;

6) 14 000r/min 离心 10～20min,倒掉上清,将 EP 管倒扣在吸水纸上轻轻控几下,除去残余在管口的液体;

7) EP 管倒置于吸水纸长,37℃烘箱 5min,确认管壁和管底没有液体残留;

8) 加入 20～50 μl 上样缓冲液,95℃加热 10min,期间用手指轻弹管壁或用 20 μl 枪头轻轻吸打,使沉淀溶解;

9) 15 000×g,离心 1min,取 10 μl 上样电泳。

(3) 上样电泳

1) 上样前将胶板下不能有气泡;

2) 所有蛋白样品调至等体积后上样,样品两侧的泳道用等体积的 1×上样缓冲液上样,Marker 也用 1×上样缓冲液调整至与样品等体积;

3) 以初始电压为 30 V 时的电压进行稳压电泳,当样品进入分离胶时将电压调为100 V 进行电泳;

4) 在目的蛋白泳动至距胶下缘 1 cm 以上结束;

5) 凝胶可放入考马斯亮蓝染色液中染色或进行蛋白质杂交。

(4) 考马斯亮蓝染色与脱色

1) 将凝胶置于染色液中，振荡染色 0.5～2 h，有时可根据染色液质量，染色过夜。

2) 脱色：用脱色液洗至背景干净、条带清晰(脱色液可用活性炭吸附后反复使用)。

(5) 蛋白质杂交

1) 电泳结束前 20min 左右戴上手套开始准备

a. 湿转使用常规电转液：Tris 3.0g，甘氨酸 14.4g，甲醇 200ml，加去离子水至 1 000ml。干转则取此转移液，每 50ml 加入 10%SDS 180 μl。

b. 浸泡 NC 膜：将 NC 膜平铺于去离子水面，靠毛细作用自然吸水后再完全浸入水中 10min 以排除气泡，随后浸泡入转移液中。PVDF 膜则在甲醇中浸泡 20min 以上后转入转移液中。将滤纸也浸入转移液中。

2) 取胶：将胶卸下，保留 30～100kDa 或分子质量范围更广些的胶(以便以后杂其他感兴趣的蛋白)，左上切角，在转移液中稍稍浸泡一下，置于洁净玻璃板上，按顺序铺上膜与每侧 1 张(干转每侧 3 张)滤纸。注意用玻棒逐出气泡，剪去滤纸与膜的过多部分(尤其是干转，以防止短路)；

3) 转膜

a. 湿转：电转槽用去离子水淋洗晾干，加入 1 000ml 电转液。将胶平铺于海绵上，滴加少许电转液再次驱赶气泡，封紧后放入电转槽，注意膜在正极一侧。降温，将电泳槽置于冰水混合物中。恒流 100 mA 过夜，或 400 mA，4 h。注意不同蛋白的要求不同。

b. 干转：用电转液淋洗石墨电极，滤纸吸干，铺上胶，再滴少许电转液，以 1.5mA/cm^2 凝胶面积转移 1～2 h。负载电压不宜超过 1V/cm^2 胶面积。

4) 封闭及杂交：封闭液与抗体溶剂均为含 5%脱脂奶粉的 PBST 或 TTBS，临用时取 200ml PBST 或 TTBS 加入 10g 脱脂奶粉即为封闭液。

a. 将膜从电转槽中取出，去离子水与 PBST 或 TTBS 稍加漂洗。

b. 必要时可先用丽春红染色观察蛋白条带，再用去离子水和 TTBS 将丽春红洗脱后封闭，如用蛋白 marker 则可省略此步。

c. 浸没于封闭液中缓慢摇荡 1 h。

d. 结合一抗：含一抗的封闭液滴加于摇床的塑料膜上，将 Western 膜从封闭液中取出，滤纸贴角稍吸干，正面朝下贴在一抗上，注意不要留下气泡，室温下轻摇孵育 1h 或 4℃静置过夜。在反应体系外面罩一湿润平皿以防止液体过多蒸发。使用反贴法时每张 3cm×9cm 膜约需 2ml 一抗稀释液。

e. 洗涤：一抗孵育结束后，用 PBST 或 TTBS 漂洗膜后再浸洗 3 次，每次 5～10min。

f. 结合二抗：根据一抗来源选择合适的二抗，根据鉴定方法选择 HRP 或 AP 标记的抗体，按相应比例稀释(1∶1 000～1∶10 000)，室温轻摇 1 h。

h. 洗涤：二抗孵育结束后，用 PBST 或 TTBS 漂洗膜后再浸洗 3 次，每次 5～10min。

5) 发光鉴定：采用 AP-NBT/BICP 显色法。取 66 μl NBT 溶液与 10ml 碱性磷酸酶缓冲液混匀，加入 33 μl BCIP 溶液。这一生色底物混合液应在 30min 内使用。将 PBST 或 TTBS 洗涤过的膜用去离子水稍加漂洗，滤纸贴角吸干，反贴法覆于 NBT/BICP 溶液液滴上，并用不透明物体(如报纸)遮挡光线，显色 20 s 后每 10 s 观察 1 次，至条带明显或有本底出现时将膜揭起置去离子水中漂洗后放滤纸上晾干即可观察与扫描。

6.8 采用酵母双杂交系统筛选与已知基因互作的其他基因

酵母双杂交系统是在真核模式生物酵母中进行的，研究活细胞内蛋白质相互作用，对蛋白质之间微弱的、瞬间的作用也能够通过报告基因的表达产物敏感地检测得到，它是一种具有很高灵敏度的研究蛋白质之间关系的技术。

1989 年，Song 和 Field 建立了第一个基于酵母的细胞内检测蛋白间相互作用的遗传系统。很多真核生物的位点特异转录激活因子通常具有两个可分割开的结构域，即 DNA 特异结合域（DNA-binding domain，BD）与转录激活域（transcriptional activation domain，AD）。这两个结构域各具功能，互不影响。但一个完整的激活特定基因表达的激活因子必须同时含有这两个结构域，否则无法完成激活功能。不同来源激活因子的 BD 区与 AD 结合后则特异地激活被 BD 结合的基因表达。基于这个原理，可将两个待测蛋白分别与这两个结构域建成融合蛋白，并共表达于同一个酵母细胞内。如果两个待测蛋白间能发生相互作用，就会通过待测蛋白的桥梁作用使 AD 与 BD 形成一个完整的转录激活因子，并激活相应的报告基因表达。通过对报告基因表型的测定可以很容易地知道待测蛋白分子间是否发生了相互作用。

酵母双杂交系统由三个部分组成：①与 BD 融合的蛋白表达载体，被表达的蛋白称诱饵蛋白（bait）。②与 AD 融合的蛋白表达载体，被其表达的蛋白称靶蛋白（prey）。③带有一个或多个报告基因的宿主菌株。常用的报告基因有 *HIS*3、*URA*3、*LacZ* 和 *ADE*2 等。而菌株则具有相应的缺陷型。双杂交质粒上分别带有不同的抗性基因和营养标记基因。这些有利于实验后期杂交质粒的鉴定与分离。根据目前通用的系统中 BD 来源的不同主要分为 GAL4 系统和 LexA 系统。

方案 9 酵母双杂交系统研究蛋白互作

1. 酵母感受态细胞的制备（LiAC 方法）

（1）菌株与试剂

1）活化菌株，AH109 或者 Y187，在 30℃，培养近 3 天，生长好的菌株，用封口膜封好，于 4℃保存，可以放置 1 个月。

2）1.1×TE/LiAC：1.1ml 10×TE 和 1.1ml 1mol/L LiAC 混合，用无菌水定容到 10ml。

3）YPDA 液体培养基：酵母提取物 10g，蛋白胨 20g，加入 900ml ddH_2O，固体培养基加入 20g 琼脂，121℃灭菌 20min，冷却至 60℃加入 100ml 20% 葡萄糖，15ml 0.2%腺嘌呤溶液。

（2）操作步骤

1）接种 2～3 mm 的 AH109 或者 Y187 单菌落（生长时间低于 4 周）到 3ml YPDA 液体培养基中（15ml 离心管）。

2）30℃，振荡培养 8h。

3）取 5μl 酵母培养液，转移到含有 50ml YPDA 液体培养基的 250ml 三角瓶中。

4）30℃，230～250r/min，培养 16-20h，使 OD_{600} 值达到 0.15～0.3。

5）室温 700g 离心 5min。

6）弃上清，用 100ml YPDA 液体培养基悬浮沉淀。

7）30℃，培养 3～5h，OD_{600}达到 0.4～0.5。

8）室温 700g 离心 5min。

9）弃上清，用 60ml 无菌水悬浮沉淀。

10）室温 700g 离心 5min。

11）弃上清，用 3ml 1.1×TE/LiAC 溶液悬浮沉淀。

12）分装到 2 个 1.5ml 的离心管中，每管 1.5ml。

13）最高速离心 15 秒。

14）弃上清，用 600μl 1.1×TE/LiAC 悬浮沉淀。

注意：制备好的酵母感受态细胞要立即用于转化；如果需要，只能在室温下储存几小时。

2. 酵母交配法建库

（1）培养基与试剂

SD/-Leu	约 5～10 个 100mm 的培养皿
SD/-Trp	约 5～10 个 100mm 的培养皿
SD/-Leu/-Trp	约 5～10 个 100mm 的培养皿
SD/-His/-Leu/-Trp	约 50 个 150mm 的培养皿
SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal	约 50 个 150mm 的培养皿

将准备好的平板在室温下放置 2～3 天，或者在 30℃放置 3h。

对照实验平行进行。

冷冻培养基：含有 25%（*V*/*V*）甘油的 YPD 培养基。

PEG/LiAc 溶液。

（2）实验步骤

1）ds cDNA 和 pGADT7-Rec 转化酵母菌株 AH109：

a. 准备感受态细胞（见上）。

b. 在一个无菌的，预冷的 15ml 离心管中加入下面的组分：

20 μl ds cDNA

6 μl pGADT7-Rec（0.5 μg/μl）

20 μl 变性鲱鱼精 DNA*

*取 50μl 鲱鱼精到离心管中，100℃，水浴 5min；然后立即在冰水中冷却。再重复一次上面的过程，然后将 DNA 加入到 15ml 的离心管中。

c. 加入 600μl 感受态细胞到含有 DNA 的离心管中，轻轻混匀；

d. 加入 2.5ml PEG/LiAc 溶液，轻轻混匀；

e. 30℃，温浴 45min；每 15min 混匀一次；

f. 加入 160 μl DMSO，混匀，42℃ 水浴 20min。每隔 10min 混匀一次；

g. 700g 离心 5min；

h. 弃上清，加入 3ml YPD Plus 液体培养基，30℃ 振荡 90min（注意：YPD Plus 可以提高转化效率；不是普通的 YPD 培养基）；

i. 700g，5min；

j. 弃上清，加入 30ml 0.9%氯化钠溶液。

2）在 SD/-Leu 平板上筛选转化子

a. 取 150 μl 酵母转化混合液，在 150mm 的平板上涂布（约 200 个平板）。

注意：检测转化效率，涂 100 μl 1∶10、1∶100、1∶1 000、1∶10 000 稀释的溶液在 100mm 的 SD/-Leu 平板上涂布。

b. 30℃培养直到菌落出现（约 3～6 天）。

c. 统计转化效率。

预期结果：≥1×10^6转化子/3 μg pGADT7-Rec。

3）收集转化子

a. 在 4℃冷却平板 3～4 小时。

b. 每个平板加入 5ml 冷冻培养基。

c. 用无菌的玻璃珠轻轻地将菌落收集到液体中。

d. 混合所有收集的菌落混合液。

e. 利用血细胞计数板统计细胞的密度。如果细胞密度≤2×10^7/ml，通过离心进行浓缩。

f. 每管 1ml 于－80℃保存（不能超过 1 年）。

g. 确定文库的覆盖性，按照 1∶100、1∶1 000 和 1∶10 000 稀释，取 100 μl 涂布到 100 mm SD/-Leu 平板上，30℃培养到菌落出现（约 2～3 天）。统计克隆数（cfu），计算文库的克隆。

4）寄主菌株与诱饵菌株进行交配

a. 室温水浴解冻 1ml（≥2×10^7个细胞）的 AH109（文库）与 5ml Y187（诱饵）（≥1×10^9 cells/ml）混合在 2L 无菌烧瓶中。

注意：烧瓶至少是 2L，保证低转速下，通风性良好。

b. 加入 45ml 2×YPDA/卡那霉素（50μg/ml），轻轻混匀。

c. 2×YPDA/卡那霉素（50μg/ml）清洗细胞。

d. 30℃，30～50r/min，轻轻振荡 20～24h。

注意：低转速保持细胞不会沉到烧瓶底部。如果转速大于 50r/min 会降低交配效率。

e. 交配 20h，取一滴在相差显微镜下观察细胞，如果有交配体出现，继续摇 4h，否则继续步骤 d。

f. 转移交配混合物到 100ml 离心瓶中，1000g，离心 10min。在此期间，用 0.5× YPDA/Kan（50μg/ml）洗两次，每次 50ml；混合洗液，悬浮沉淀。

g. 1000g，离心 10min；用 10ml 0.5×YPDA/卡那霉素（50μg/ml）悬浮沉淀；计量体积。

5）选择相互作用蛋白的二倍体

a. 检测交配效率：100 μl 1∶10 000、1∶1 000、1∶100、1∶10 稀释交配混合液（100mm 培养皿），涂布下列平板。

SD/-Leu

SD/-Trp

SD/-Leu/-Trp

b. 涂布剩余的混合物到 TDO 或者 QDO（200 μl/ 150mm）

TDO：SD/-His/-Leu/-Trp

QDO：SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp

c. 30℃培养，直到菌落出现；2～3 天后，菌落可见，但是平板要继续培养到 5 天，保证生长慢的克隆生长。忽略那些生长了 2 天后，直径小于 1 mm 的白色菌落。真正的 Ade^+，His^+ 克隆生长旺盛，直径 >2 mm。同时，Ade^+ 是白色或者浅粉红色。Ade^- 克隆在腺嘌呤缺乏的培养基上显示红色，而且生长缓慢。

d. 选择 SD/-Leu，SD/-Trp，and SD/-Leu/-Trp；统计交配效率和克隆数目；

e. 在 TDO 培养基上生长的菌落，复制到 QDO 平板上；30℃ 培养 3～8 天；

f. 选择 Ade^+，His^+ 的克隆做进一步的分析；

g. 在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal 上划线，30℃，2～4 天，观察显色情况；

h. 用封口膜封住样板于 4℃保存。如果必要，选择感兴趣的克隆到甘油中保存于－70℃（图 11-3）。

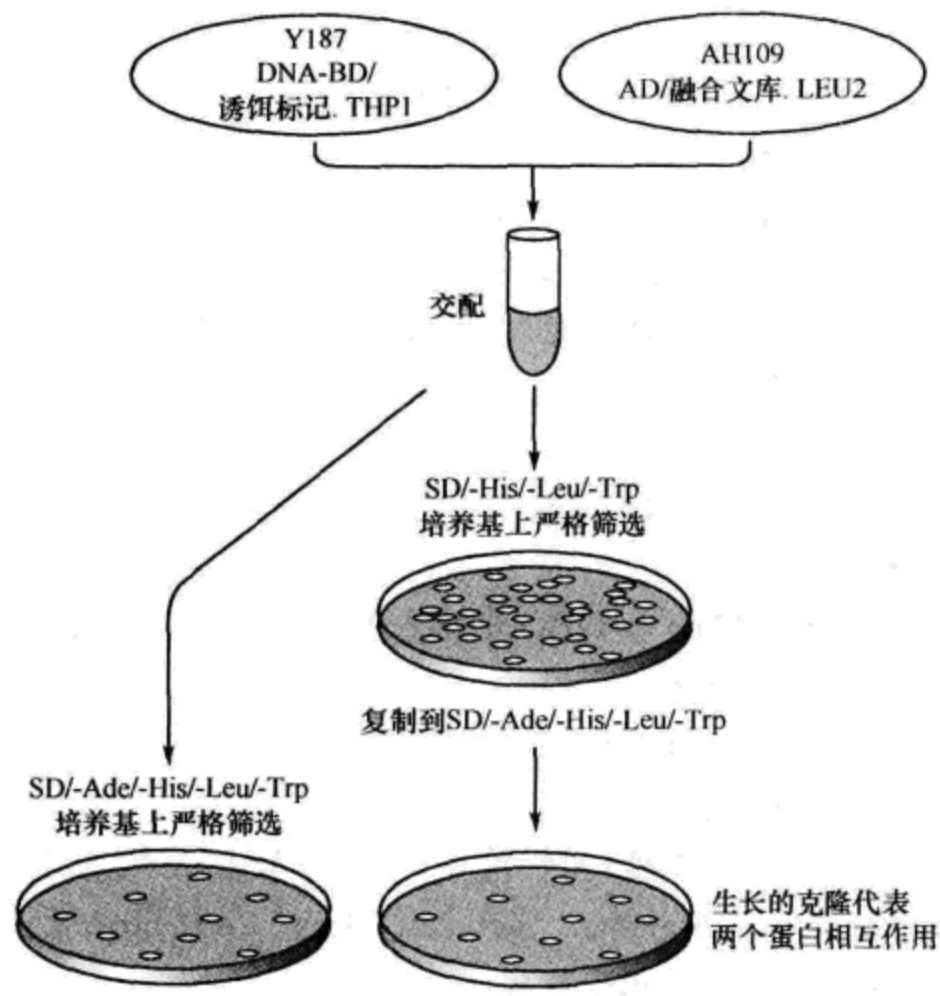


图 11-3　酵母双杂交流程

3. 共转化的方法建库

(1) 试剂与培养基平板

1) SD 平板

SD/-Leu	约 5～10 个 100mm 培养皿
SD/-Trp	约 5～10 个 100mm 培养皿
SD/-Leu/-Trp	约 5～10 个 100mm 培养皿
SD/-His/-Leu/-Trp	约 50 个 150mm 培养皿
SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal	约 50 个 150mm 培养皿

共转化之前，将 SD 平板在室温下干燥 2～3 天或者在 30℃下放置 3h。

2) 对照实验需要平行进行。

3) 准备冷冻培养基：含有 25%（V/V）甘油的 YPD 培养基。

4) 准备 PEG/LiAc 溶液。

(2) 实验步骤

1) ds cDNA, pGADT7-Rec,和 pGBKT7/bait 转化 AH109

a. 准备感受态细胞。

b. 在一个 15ml 的管子中加入下面的物质

20 μl ds cDNA

6 μl pGADT7-Rec (0.5 μg/μl)

5 μg pGBKT7/诱饵质粒 DNA (≤10 μl)

20 μl 变性鲱鱼精 DNA *

* 取约 50 μl 鲱鱼精 DNA 到离心管中,100℃ 加热 5min,然后,将 DNA 立即放到冰浴中冷激;重复一次。

c. 加入 600 μl 感受态到上面的混合液中,轻轻混匀。

d. 加入 2.5ml PEG/LiAc 溶液,轻轻混匀。

e. 将混合液在 30℃ 放置 45min,每 15min 轻轻混匀一次。

f. 加入 160 μl DMSO 到混合液, 混匀。

g. 42℃ 水浴 20min,每 10min 轻轻混匀一次;700g 离心 5min。

h. 弃上清,加入 3ml YPD plus 液体培养基,30℃摇 90min。

i. 700g 离心 5min。

j. 弃上清,沉淀悬浮在 6ml NaCl 溶液 (0.9%)。

2) 选择蛋白互作表达的转化子

a. 涂布共转化混合物到 TDO 和 QDO 培养基上 (150 μl / 150mm)。

TDO: SD/-His/-Leu/-Trp

QDO: SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp

b. 30℃ 培养直到菌落出现。

c. 在 TDO 培养基上生长的克隆,复制到 QDO 培养基上,30℃ 培养 3～8 天。

d. QDO 培养基上生长的克隆涂布到 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal 培养基上,30℃ 培养 2～4 天,蛋白互作表达的转化子显蓝色。

e. 用封口膜封住样板于 4℃ 保存,如果必要,选择感兴趣的克隆到甘油中保存于－70℃。

方案 10　细胞表达目的蛋白

由于真核细胞的翻译过程和原核细胞不同,许多真核细胞中的蛋白质的表达在大肠埃希菌中并不合适;真核生物的基因的密码子也有许多偏好性,因此,要表达从真核生物中克隆的基因产物,往往需要在真核细胞中表达才行。一般来讲,在这样的要求下,往往需要在酵母细胞中进行表达。下面的方法是用酵母表达真核细胞的目的基因的常用操作方案。用常用的克隆方法在大肠埃希菌中构建好所要表达的载体后,就可以进入下面的操作程序。

1. 试剂与培养基

(1) 0.1mol/L $NaH_2PO_4 \cdot Na_2HPO_4$, pH 7.4

1) 将 13.8g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 溶于 90ml 去离子水,定容至 100ml,过滤除菌。

2) 将 26.81g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 溶于 90ml 去离子水,定容至 100ml,过滤除菌。

3）混合 22.6ml 1mol/L NaH_2PO_4和 77.4ml 1mol/L Na_2HPO_4，过滤除菌，室温保存。

(2) 10×TE

1）称取 1.21g Tris 碱，0.37g EDTA 溶于 90ml 去离子水。

2）用 HCl 调节 pH 至 7.5，定容至 100ml。

3）过滤除菌，室温保存。或者用 1mol/L Tris-HCl，pH 7.5 和 0.5mol/L EDTA，pH 8.0 配制。

(3) 1×TE：用无菌水将 10×TE 稀释 10 倍即得。

(4) 10×LiAc：1mol/L LiAc，pH 7.5

1）称取 10.2g LiAc 溶于 90ml 去离子水。

2）用冰醋酸调节 pH 至 7.5 并定容至 100ml。

3）过滤除菌，室温保存。

(5)1×LiAc 100 mmol/L LiA，pH 7.5：用无菌水稀释 10×LiAc 即得。

(6)1×LiAc/0.5×TE

1）混合 10ml 10×LiAc 和 5ml 10×TE。

2）用去离子水定容至 100ml。

3）过滤除菌，室温保存。

(7)1×LiAc/40% PEG-3350/1×TE

1）混合 10ml 10×LiAc，10ml 10×TE，40g PEG-3350；此溶液现配现用。

2）加去离子水至 100ml 溶解 PEG，可以加热以充分溶解 PEG。

3）121℃灭菌 20min，室温保存。

(8)YPD(YEPD)培养基：酵母提取物 10g，蛋白胨 20g，加入 900ml ddH_2O，固体培养基加入 20g 琼脂，121℃灭菌 20min，冷却至 60℃加入 100ml 20% 葡萄糖。液体培养基可室温保存，固体平板 4℃保存。

(9)SD-N 培养基：0.17% 不含氨基酸和硫酸的胺酵母氮源，2%葡萄糖。

(10)SC 培养基：0.17% 酵母氮源，2%葡萄糖，0.01%的腺嘌呤、精氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、色氨酸、尿嘧啶，0.005% 的天冬氨酸、组氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸；定容至 1L。固体培养基中加入 2%琼脂粉。

(11)SC-U 培养基：将 SC 培养基中的尿嘧啶去除。

2. 方法与步骤

(1) 酵母感受态的制备与转化

1）挑取酵母突变体单菌落于 10ml YPD 培养基中 30℃培养过夜。

2）测定过夜培养物的 OD_{600}值，稀释于 50mlYPD 培养基中，使其 OD_{600}达到 0.4，然后再培养 2～4 h。

3）2500 r/min 离心沉淀细胞，用 40ml 1×TE 悬浮细胞。

4）2500 r/min 离心沉淀细胞，用 2ml of 1×LiAc/0.5×TE 悬浮细胞。

5）悬浮细胞室温放置 10min。

6）混合 1μg pYES2-ATG4 质粒 DNA 、100 μg 变性鱼精 DNA、100 μl 步骤 5)中的酵母悬浮液。

7）加入 700 μl 的 1× LiAc/40% PEG-3350/1×TE 并混匀。

8) 30℃培养 30min。

9) 加入 88 μl DMSO,混匀,42℃热激 7min。

10) 离心 10 s,除去上清。

11) 用 1ml 1×TE 悬浮细胞并再次离心。

12) 用 50～100 μl 1×TE 悬浮细胞并涂筛选平;板。

(2) 酵母菌落 PCR

1) 酵母 DNA 的准备

a. 用移液枪头将整个菌落转移至离心管,加入 30μl 0.2% SDS。

b. 涡旋 15 s。

c . 90℃热激 4min。

d. 离心 1min,上清转移至一新管中,粗提 DNA 可于—20℃保存。

2) PCR 反应体系

a. 在冰上加入下列成分

10× 菌落 PCR 缓冲液	5μl
25 mmol/l $MgCl_2$	3μl
10 mmol/l dNTP 混合液	1μl
25% Triton X-100	2μl
50μmol/l 引物 1	0.4μl
50μmol/l 引物 2	0.4μl
Taq 聚合酶(5 U/ml)	1μl
ddH_2O	31.2μl
粗提 DNA	1μl

b. 混匀后放入 PCR 仪中。

7 真菌中结合 PCR(Double-Joint PCR)基因融合片段操作

在分子生物学操作中,不同的 DNA 片段的连接一般主要通过限制性内切酶的操作来完成。如目的基因与报告基因连接,用于基因表达定位等;目的基因与其他启动子连接,用于在一定条件下表达基因产物;基因的不同片段连接,用于敲除/替换载体的构建等。在这些实验中,载体上的酶切位点的设计非常重要,试验能否正常进行,所需操作的 DNA 片段上的酶切位点对采用的试验步骤有重要影响。PCR 也是一种 DNA 高效合成的重要手段,采用结合 PCR 方法构建融合基因,方法更加简单易行,省时省工。

结合 PCR 的原理非常简单,也很精巧。一般的 PCR 是用一对特异性寡核苷酸引物,利用碱基互补配对原则,在模板 DNA 的指导下,高温 DNA 聚合酶将 dNTP 加到引物下端,从而合成新的 DNA。如果 2 个 DNA 片段的末端存在互补序列,在进行 PCR 时,这 2 个 DNA 片段在退火过程中就能够通过碱基互补配对原则结合在一起,从而相互以对方为模板,合成新的 DNA 片段,合成的结果是这 2 个片段融合在一起,形成了一条新的 DNA 片段。当然,这时的 PCR 产物不可能都是融合的新片段,因此在用两端的引物进行新一轮 PCR,就得到了比较纯净的融合片段(图 11-4)。在这个过程中,就不需要考虑酶切位点等问题,且

PCR 产物可以直接克隆，在一些真菌研究中甚至可以直接进行原生质体转化。

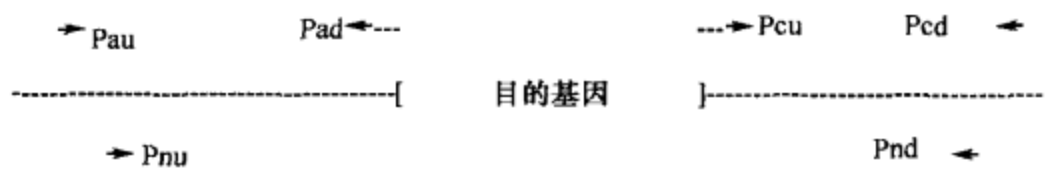


图 11-4　结合 PCR 引物设计(Yua et al.，2004)

要实现这样的 PCR，得到具有首尾能够碱基互补的 DNA 片段是关键。因此，在设计引物进行一般 PCR 时，在引物的前端加上另一 DNA 片段的末端互补序列，则 PCR 以后，就得到了这样的 DNA 片段。一般加在引物前端的互补序列的长度是 25～30bp 大小。在这样的引物作用下，第一轮 PCR 得到相应单独的 DNA 片段，第二轮 PCR 反应体系中不加模版，而以第一轮的 PCR 产物即为模板又为引物扩增，得到融合的 PCR 产物，反应后体系中往往还有没有反应完全的原来的 DNA 片段。然后进行第三轮 PCR，将第二轮的 PCR 产物稀释 20～50 倍为模板，用融合片段两端的序列为引物，继续一次 PCR，得到比较纯净的目的融合片段。

常用的结合 PCR 一般分为单结合 PCR 和双结合 PCR 2 种，下面分别介绍。

7.1　单结合 PCR(Single-joint PCR，SJ-PCR)

用于构建两个 DNA 片段的融合片段，如通用启动子与所要表达的基因进行融合。

(1) 药品与仪器：所需的试剂药品和仪器与一般 PCR 相同。

(2) 实验步骤

1) 根据所要进行融合的 DNA 片段序列信息，设计并合成 3 对引物。

第一对引物根据片段 1 设计的引物，上游引物为 P1u，下游引物 P1d-t1，P1d-t1 引物是在正常的下游引物 P1d 的前面加上“a”(由于 Taq 酶的特点是在 PCR 产物的 3′-末端加“a”)，再加 15～25 个片段 2 的碱基序列，碱基顺序是和片段 2 的上游引物所在的序列反向互补。

第二对引物根据片段 2 设计，上游引物为 P2u-t2，下游引物 P2d，P2u-t2 引物是在正常的下游引物 P2u 的前面加上“a”(由于 Taq 酶的特点是在 PCR 产物的 3′-末端加“a”)，再加 15～25 个片段 1 的碱基序列，碱基顺序是和片段 1 下游引物所在的序列反向互补。

第三对引物根据融合片段设计，上游引物在片段 1 上，下游引物在片段 2 上，通过这对引物可以将融合的目的片段扩增出来，在这对引物上还可以加上合适的限制性内切酶的酶切位点。有时这对引物可以用 P1u 和 P2d 来代替。

2) 进行第一轮 PCR：这一次扩增过程是利用第一对引物和第二对引物，扩增出目的片段 1 和目的片段 2。扩增过程与一般 PCR 相同。如果由于在引物前端加上了融合接头而影响扩增，则可以先用正常的引物将 2 个片段分别扩增，然后各自稀释 50 倍后作为模板，再用第一对引物和第二对引物分别各自扩增，得到加了融合接头的目的片段。

3) 进行第二轮 PCR：将第一轮 PCR 后获得的 2 个目的片段纯化后，按照 1 ∶1 的分子数比例混合在一起，加到 PCR 管中，每个片段的量是 200～1000ng。这两个片段在 PCR 反应中既是模板，也是引物。再在 PCR 管中加入 dNTP 和 Taq 酶，不加其他引物，其他成分与一般 PCR 相同。

扩增程序为:94℃ 3min;然后按以下设置进行 10 个循环:94℃ 30s,58℃ 2min,72℃ 5min。最后 72℃延伸 10min。

4) 进行第三轮 PCR:将第二轮的 PCR 产物 1μl 为模板,用第三对引物进行 PCR。PCR 扩增程序与正常的一般 PCR 一致。如果片段超过 3kb,要用能够扩增长片段的 Taq 酶进行,许多生物技术公司可以提供这样的酶,而一般的 Taq 酶扩增 3kb 以上的片段比较困难。同样的,融合片段的克隆也要用特殊的载体,如 prmege 公司的 pEGM-T easy,或者 invitrogen 公司的 XL-topo 载体等。

7.2 双结合 PCR(Double-joint PCR, DJ-PCR)

用于构建三个 DNA 片段的融合片段,如敲除/替换载体的构建、启动子与目的基因及报告基因的构建等(图 11-5)。

(1) 药品与仪器:所需的试剂药品和仪器与一般 PCR 相同。

(2) 实验步骤

1) 引物设计与合成:进行这样的试验,必须掌握所要进行融合的三段 DNA 片段的序列信息。根据序列信息设计并合成 4 对引物。为了叙述方便,我们将这 3 段 DNA 片段称为片段 A、片段 B、片段 C,融合后的排列顺序是片段 A—片段 B—片段 C,其中在融合片段中间的是片段 B(图 11-6)。

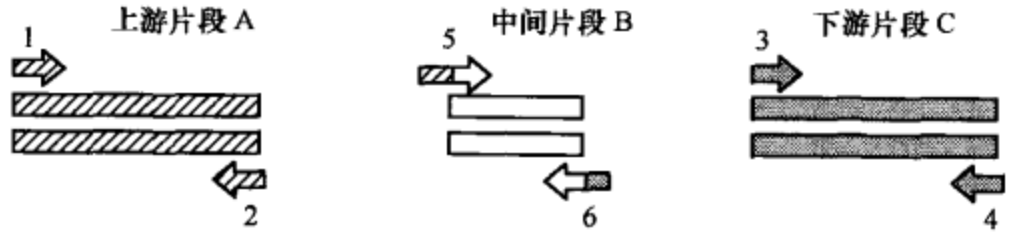


图 11-5 采用结合 PCR 构建敲除、替换载体引物(Yua et al.,2004)

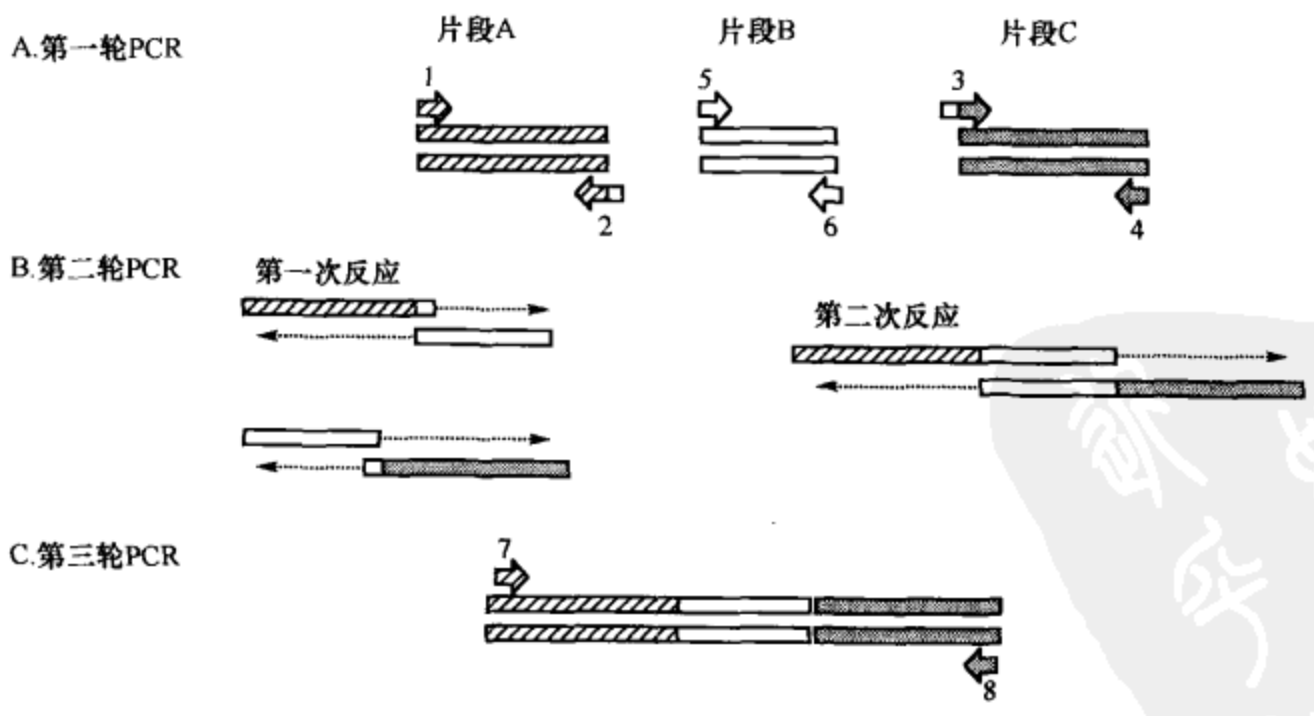


图 11-6 DJ-PCR 工作原理(Yua et al.,2004)

对于三段 DNA 片段的融合,融合接头序列可以设计在中间片段(片段 B)的 2 端引物上,也可以设计在前端片段(片段 A)的下游引物和后端片段(片段 C)的上游引物上。如果

中间片段(片段 B)经常应用,如敲除/替换载体的抗性标记基因,则可以先用普通的特异引物扩增出来长期存放,需要时作为模板,用带有两端融合接头的引物扩增出所需要的中间片段即可(带有可以与片段 A 和片段 C 融合的接头)。

对于片段 B 带有融合接头的引物设计,扩增片段 A 和片段 C 的 2 对引物与一般引物的设计相同,分别记为 Pau、Pad(第一对)及 Pcu、Pcd(第三对)。

第二对引物根据片段 B 设计的引物,上游引物记为 Pbu-a-Sa,下游引物记为 Pbd-a-Sc,Pbu 和 Pbd 是片段 B 的正常 PCR 特异引物,Sa 是片段 A 的 3′端的 25～30 个碱基序列,由于 Taq 酶的特点是在 PCR 产物的 3′端加“a”,所以在 Pbu 和 Sa 之间多一个“a”。同理,Sc 是与引物 Pcu 互补链的 3′端的 25～30 个碱基序列。

对于前端片段(片段 A)的下游引物和后端片段(片段 C)的上游引物上引入融合接头序列的引物设计,原理与以上的介绍相同,简要地说,就是第一对引物是 Pau 和 Pad-a-Sb1,第二对是 Pbu 和 Pbd,第三对是 Pcu-a-Sb2 和 Pcd,其中 Sb1 是与引物 Pbu 所在的 DNA 链互补的链的 3′-端的 25～30 个碱基序列,而 Sb2 是片段 B 的 3′端的 25～30 个碱基序列。这种设计的好处是,如果中间片段(片段 B)经常应用,如敲除/替换载体的抗性标记基因,则可以先用普通的。

2) 第一轮 PCR:这一次扩增过程是利用设计好的第一对、第二对、第三对引物,分别扩增出片段 A、片段 B、片段 C,扩增过程与一般 PCR 相同。如果由于在引物前端加上了融合接头而影响扩增,则可以先用正常的引物将 2 个片段分别扩增,然后各自稀释 50 倍后作为模板,再用第一对引物和第二对引物分别各自扩增,得到加了融合接头的目的片段。

3) 进行第二轮 PCR:将第一轮 PCR 后获得的三个目的片段纯化后,按照 1∶3∶1 的分子数比例混合在一起,加到 PCR 管中,每个片段的量是 200～1000ng。这 3 个片段在 PCR 反应中既是模板,也是引物。再在 PCR 管中加入 dNTP 和 Taq 酶,不加其他引物,其他成分与一般 PCR 相同。如在 50μl 体系中,含有 5μl 的 10×PCR 缓冲液,4μl dNTP(2.5 mmol/L),0.5μl Taq 酶(2U),1μl 片段 A(0.5μg/μl),3μl 片段 B(0.5μg/μl),1μl 片段 C(0.5μg/μl),35.5μl 三蒸水。

扩增程序为:94℃ 3min;然后按以下设置进行 10 个循环:94℃ 30s,58℃ 10min,72℃ 15min。最后 72℃延伸 10min。(退火时间一般为 2～10min。)

4) 进行第三轮 PCR:将第二轮的 PCR 产物 1μl 为模板,用第四对引物进行 PCR。PCR 扩增程序与正常的一般 PCR 一致。由于融合片段较长,此轮 PCR 要用能够扩增长片段的 Taq 酶进行,许多生物技术公司可以提供这样的酶。同样的,融合片段的克隆也要用特殊的载体,如 prmege 公司的 pEGM-T easy,或者 invitrogen 公司的 XL-topo 载体等。

对于一些试验,如基因敲除/替换研究,PCR 产物也可以经过试剂盒纯化后,直接转化真菌的原生质体而无需再克隆。

如果第二轮 PCR 的产物是长于 5kb 的片段,推荐的程序是:94℃ 2min,然后按以下设置进行 15 个循环:93℃ 45s,62℃ 12min,68℃ 12min。最后 72℃延伸 10min。第三轮 PCR 循环程序:94℃ 2min,然后按以下设置进行 35 个循环:93℃ 45s,62℃ 45s,68℃ 12min。最后 72℃延伸 15min。扩增用的聚合酶必须用扩增长片段的 Taq 酶进行(LA Taq polymerase)。

8 真菌 RNAi 技术的应用

真菌是真核生物，种类繁多，形态多样，从单细胞酵母到形成大型子实体的蘑菇，遍及人类生活的各个领域。真菌分布广阔，从极端环境到寄生人体细胞，具有重要的经济意义。许多真菌形态分化明显，培养简单，生活周期短，称为研究真核生物生长发育的模式。随着基因组测序技术的发展，已有 80 余种重要真菌的基因组测序已经完成，许多是与人类生活关系密切的种类，如：生物模式菌构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）和粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*），工业上常用菌米曲霉（*Aspergillus oryzae*），水稻的重要病原真菌稻瘟病菌（*Magnaporthe oryzae*），担子菌玉米黑粉菌（*Ustilago maydis*），动物病原真菌烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*），人体和动物的机会性寄生菌（*opportunistic human pathogen*）白色念珠菌（*Candida albicans*）和新型隐球酵母菌（*Cryptococcus neoformans*）等，标志着真菌研究的功能基因组时代的到来。如何在这些序列基础上鉴定基因的功能，称为真菌研究者乃至生物学研究者的重要课题。明确这些序列的生物学特性已成为当前研究中的热点问题。

在基因功能研究方法中，基因敲除方法应用时间长，理论体系完备，构建方法成熟。一般的载体构建特点是将目的基因的 2 个片段中间插入抗性标记基因，然后转化真菌。在真菌细胞中，通过同源重组，抗性基因替换了原来的基因片段，从而造成基因序列缺失或部分缺失而失去功能。但工作量大，需要的时间长，并且对多拷贝基因无法应用等缺陷，在一定程度上限制了这些技术在基因功能研究中的应用。还有一种基因敲出方法是非同源转化，但是要构建 KU80 同源基因的突变体菌株，使菌株失去对外源插入片段的修复能力而提高基因敲除效率。近年来 RNAi 技术的完善和在动植物研究中的广泛应用，显示了很强的优越性。RNAi 技术快速简便、通用性强、靶向性高，被迅速应用到真菌的基因功能研究中，并已经取得了很好的进展。

8.1 RNAi 的原理及相关过程

8.1.1 RNAi 的关键步骤是双链 RNA 的裂解

在芽殖酵母中，染色体的着丝点含有许多重复的核苷酸序列。其中有些序列可以转录，但很快被依赖 RNA 的 RNA 聚合酶（RdRP）Rdp1 和 Dicer 酶作用，形成 22～24nt 的 RNA 二聚体，并与一个 Argonaute 蛋白等装配形成 RNA 诱导的转录沉默复合体（RNA-induced transcriptional silencing (RITS) complex），进而形成 siRNA 并诱导附近的基因沉默，并对细胞分裂期异染色质的维持非常重要。在转录后基因沉默中，Argonaute 蛋白的 PAZ 保守结构域与 siRNA 结合，这个结构被 PIWI 引导，对靶 RNA 进行切割，从而引起基因沉默。RNA 干扰（RNAi）是由 3 个独立的研究发现的。最著名的是在线虫的研究中发现，双链的 RNA 可以诱导基因沉默的发生。此前，在植物和真菌的研究中发现，转到细胞内的基因的表达或者病毒的复制可以产生基因沉默。在植物中检测了单链的小 RNA（siRNA）在基因沉默中的作用，并将动植物细胞中 RNAi 的机制联系起来。再有就是在线虫的研究中发现 MicroRNA 在发育调节中的作用。通过 RNAi 途径产生的 siRNA 通过碱

基互补配对原则与靶 mRNA，然后由一种 RNase H 核酸水解酶-Argonaute(Slicer，剪切者)将 mRNA 降解，从而导致基因沉默。如果 siRNA/mRNA 双链复合体含有错配的碱基，则不引起核酸降解，而是引起翻译抑制，从而引起基因沉默。Dicer 酶和 RISC 复合体在功能上不是独立的，而是相互合作，才能产生 siRNA。

小 RNA 的产生是由Ⅲ型核酸酶催化完成的。Ⅲ型核酸酶分为 3 个类型，类型Ⅰ在细菌和酵母中发现，含有 1 个Ⅲ型核酸酶结构域；Ⅱ型和Ⅲ型都含有 2 个Ⅲ型核酸酶结构域，Ⅲ型还含有 1 个解旋酶结构域和 1 个 PAZ 结构域。PAZ 结构域也存在于 Argonaute 蛋白家族成员中，对于 RNAi 过程至关重要，因此认为Ⅲ型是 RNAi 的起始酶。此推测在果蝇细胞系统的 Dicer-1 的研究中得到证实。Dicer 酶以单体的形式作用于双链的 RNA，2 个催化结构域形成类似二聚体(假二聚体)的形式，一个结构域只剪切双链 RNA 的一条链，从一端开始，将靶 RNA 逐步降解。剪切的核苷酸长度是由假二聚体的排列长度决定的(图 11-7)。这个酶还参与 miRNA 的形成。

RNAi 最后结果是靶 mRNA 被水解破坏。此过程是由多蛋白复合体 RISC 完成。在此复合体的中心是 Argonaute 蛋白家族成员。这类蛋白具有裂解 mRNA 的功能。另外，RISC 蛋白复合体还有阻止未降解的 mRNA 进行翻译的功能，是典型的 microRNA 介导的基因沉默的模型。

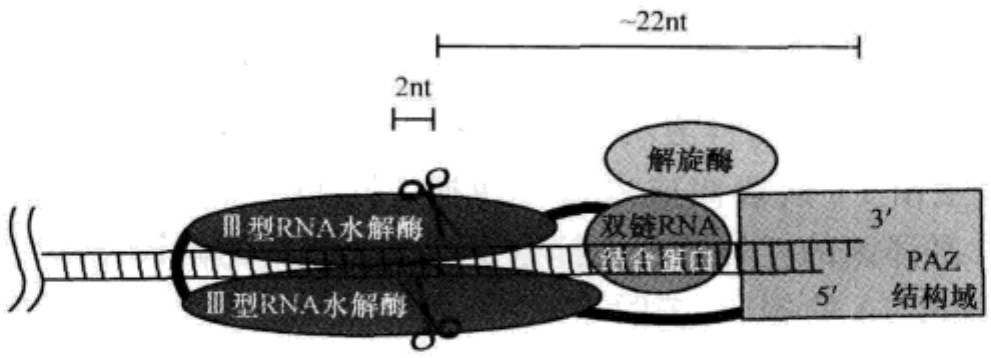


图 11-7　Argonaute 蛋白的催化作用(Hammond，2005)

在 RNAi 途径中的裂解催化过程比较复杂。在 RISC 复合体中，siRNA 的 5′端与 Argonaute 蛋白的 Piwi 结构域相结合。5′端的磷酸基非常重要，可以保证 Piwi 结构域与 4 个保守性氨基酸残基高亲和性结合；siRNA 的 5′端从 Piwi 结构域中伸出。靶 mRNA 的二聚体区域首先在 Piwi 结构域中的 siRNA 的 5′端形成，虽然 mRNA 的裂解效率与 siRNA 的 3′端二聚体的形成相关，但是 mRNA 与 Piwi 结构域的亲和性主要依赖 siRNA 的 5′端二聚体的形成。裂解催化引擎是 Piwi 结构域中的 RNase H 核酸水解酶的 β 折叠结构。虽然 RNase H 在一般情况下是催化 RNA/DNA 二聚体的裂解，形成 5′-磷酸和 3′-羟基结构的产物，但在 RNAi 途径中，Argonaute 蛋白的 Piwi 结构域催化 RNA 二聚体裂解形成类似的产物。

Dicer 酶也参与 RISC 复合体(RNA-induced silencing complex)的功能。虽然在一般的解释中 Dicer 酶的作用是产生引导性的 siRNA，但是在 Dicer 酶的缺失突变体中，外源 siRNA引起的 RNAi 的效率大大降低。而且，外源引进的双链发夹结构比直接添加 siRNA 引起的 RNAi 的效率更高。这些研究表明 Dicer 酶和 RISC 复合体的功能有密切的联系。研究进一步表明，在 RISC 复合体形成早期，Dicer 酶和 dsRBD 复合物与 siRNA 结合在一起，参与 RISC 复合体的装配。

8.1.2 MicroRNA 的发现与作用

在各类生物细胞中，非编码 RNA 具有许多重要的基因表达调节功能，从细菌的基因拷贝数的控制到哺乳动物的 X 染色体上相关基因的表达抑制，都需要非编码 RNA 参与。MicroRNA(miRNA)是一类 21～25 个核苷酸的小分子 RNA，在转录后水平上对基因的表达进行负调节。miRNA 的许多成员开始在线虫中发现时，被看做是小分子暂时 RNA 分子(small temporal RNAs ，stRNAs)，调节线虫的发育转换。后来的研究表明，stRNA 是 miRNA 的原型，在各种细胞中广泛存在，调节许多生理和发育过程。miRNA 是通过 RNA 干扰途径发挥其功能。

miRNA 是在研究线虫胚胎发育过程中发现的。在线虫的研究中，根据幼虫发育不同阶段的特点，将线虫的细胞系分成 4 类，即 L1-L4。突变体 lin-4 表现出幼虫发育暂时缺陷，在以后的发育过程中进行重复地细胞分裂，不能顺利进入以后的发育阶段。通过分子生物学研究，发现 lin-4 位点转录成 22 个核苷酸的非编码 RNA，可以与 lin-14 基因的 3′端非翻译区的 7 个保守位点互补。lin-14 基因编码一个核蛋白，调节线虫从 L1 阶段向 L2 阶段发育。lin-14 蛋白的表达需要其 mRNA 具有完整的 3′端非翻译区。lin-4 对 lin-14 基因的负调节作用的机制揭开了一个分子生物学和生物化学研究的新篇章。lin-4 还通过相同的机制，对 lin-28 进行调节。lin-28 基因编码一个冷激蛋白，调节线虫从 L2 阶段向 L3 阶段发育。通过对 lin-14 基因和 lin-28 基因的对比，发现了数个 lin-4 的结合位点。到 2000 年，通过正向遗传性方法，发现了称为 let-7 的第二个 miRNA。let-7 编码 21 个核苷酸，调控线虫由 L3 阶段向成虫发育转换。同 lin-4 相似，let-7 是通过与 lin-41 和 lin-57 的 3′端的非翻译区的互补结合而抑制了这 2 个蛋白的翻译。let-7 的鉴定意义不仅是提供了另一个 miRNA 的例证，表明小 RNA 可以调节一些重要基因的表达，还暗示了不仅在线虫中，而且在广泛的生物细胞中，都有这种调节机制的可能性。生物信息学的研究表明，在生物细胞中存在众多的基因编码小 RNA，说明 miRNA 对基因表达的调节作用是一个非常普遍的机制。

8.1.3 miRNA 和 siRNA 的区别

从各种生物体中鉴定的 miRNA 已经达到数百的规模，其分子特性已经通过对 let-7 和 lin-4 的系统研究得到很好的揭示，并且也为鉴定 miRNA 提供了依据。miRNA 一般在 21～25 个核苷酸之间，由较大的可以形成不完整的茎环结构的前体 RNA 经过加工形成的小分子非编码 RNA。在 2 个核酸酶的作用下，前体 RNA 的发夹结构的一个臂被水解下来，成为成熟的 miRNA。

在发现第二个 miRNA 即 let-7 的同时，RNAi 的研究也取得了巨大进展。RNAi 机制在进化上保守，是被双链 RNA 诱导发生的基因序列特异性基因沉默。在许多植物系统中，用于起始 RNAi 的结构是引入约 500bp 的双链 RNA。起始结构最终在细胞中加工成为长度大小为 21～25bp 的双链 RNA，称为 siRNA。其中一条链选择性地与效应复合体 RISC (the RNA-induced silencing complex)结合。保守性的 RNAi 机制可能反映了真核细胞对外源病毒或其他寄生性核酸的防卫性反应，在植物细胞中，RNAi 的相关成分突变可以抑制对病毒的抗性，说明 PTGS 基因沉默介导对病毒 RNA 的破坏。另外，有些 siRNA 也可以

在转录水平上调节基因的表达，如 siRNA 不但可以在植物中诱导序列特异性的启动子甲基化，在酵母中对异源染色体的形成和动物细胞中的转座沉默也非常重要。

从本质上讲，siRNA 和 miRNA 具有相似的分子特征、产生机制和功能效应。因此，要对这 2 类分子进行明确区分存在困难。不同的称谓可能主要反映开始发现时的途径不同。siRNA 和 miRNA 的产生需要相同的Ⅲ型核酸水解酶，即 Dicer 酶，还有相同的效应复合体用以完成转录后的基因沉默。从另一方面来讲，二者的不同主要体现在来源不同，还有就是与靶位的结合模式不同。miRNA 的来源是细胞中基因组编码并经转录形成的特异的前体 RNA 分子，前体转录本的结构和核内的识别机制决定了成熟 miRNA 的序列和结构。而 siRNA 主要由外源的长片段的双链 RNA 随机裂解形成，或者内源基因的双向转录并退伙形成双链 RNA 而产生。许多情况下，miRNA 与靶基因的 3′端非翻译区有多个位点通过不完全互补完成，在翻译水平负调节基因的表达。相反，siRNA 与靶基因是在一个位点特异性完全互补结合，在互补位点将靶基因裂解(图 11-8)。

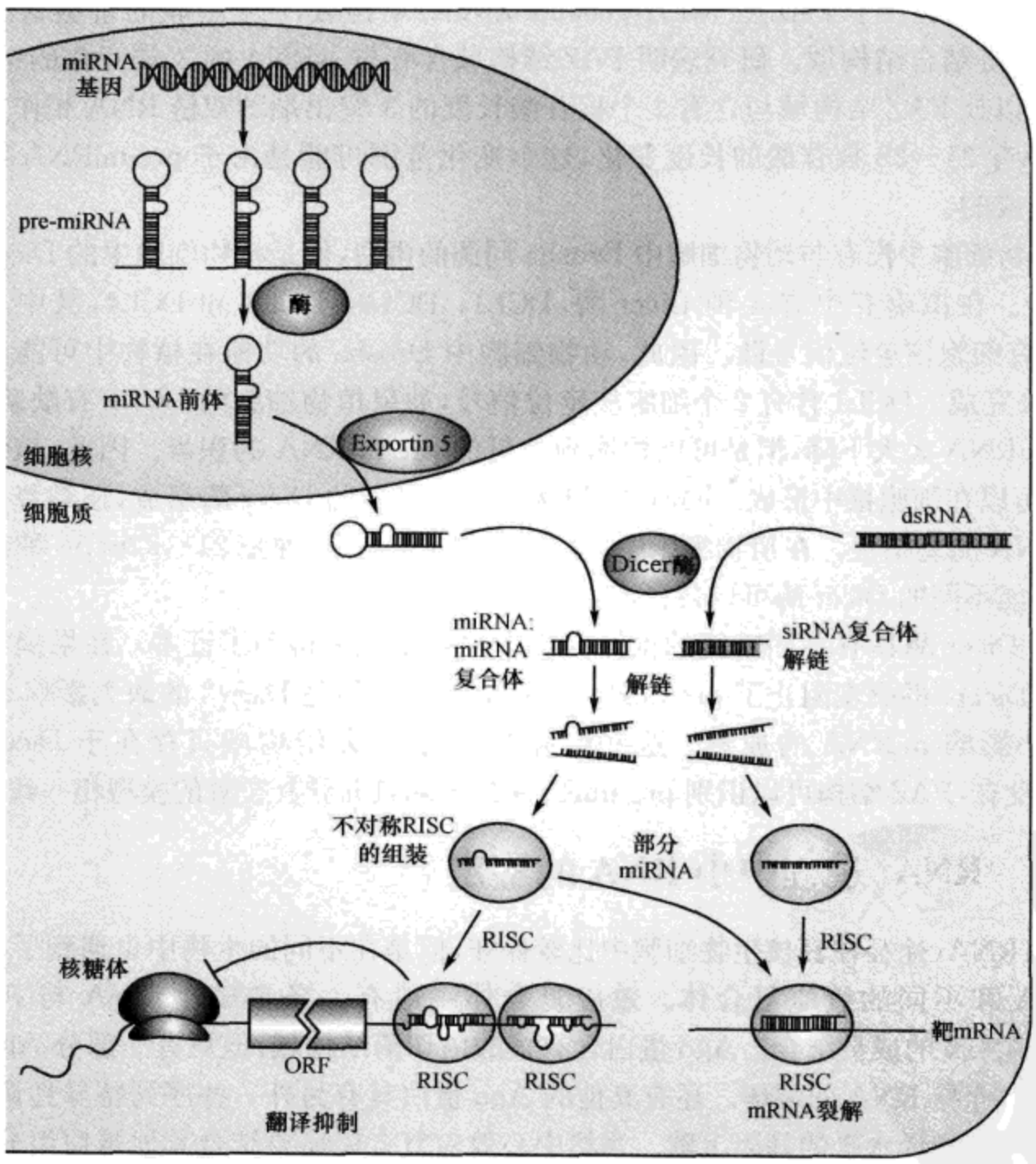


图 11-8　细胞中 siRNA 和 miRNA 的来源和作用机制(He et al.，2004)

8.1.4 miRNA 的成熟

在动物细胞中，miRNA 的成熟分为 2 步，第一步是新形成的 miRNA 前体转录本（pri-miRNA）加工成约 70 个核苷酸的前体（pre-miRNA），第二步是 pre-miRNA 紧接着裂解形成约 21～25 个核苷酸大小的成熟 miRNA。这个按一定顺序裂解成熟的过程由 2 个Ⅲ型核酸酶（RNase-Ⅲ enzymes）催化完成，分别称为 Drosha 和 Dicer，这 2 个酶都是特异性双链 RNA 内切核酸酶，在裂解位点产生 2 个核苷酸长度的 3′突出端。Drosha 主要定位在细胞核中，含有 2 个串联的Ⅲ型核酸酶结构域，一个双链结合结构域，还有一个氨基酸末端序列。无论前体转录本即 pri-miRNA 的序列和结构如何，Drosha 都可以裂解成含有不完全配对的茎环结构的约 70 个核苷酸的 pre-miRNA。然后 pre-miRNA 从细胞核进入细胞质，这个过程由运转蛋白 Exportin5（Exp5）完成。在细胞质中，Dicer 酶将这些具有发夹结构的前体裂解成不完全配对的小双链 RNA。Dicer 酶含有解旋结构域，一个 DUF283 结构域，一个 PAZ（Piwi-Argonaute-Zwille）结构域，2 个串联的Ⅲ型核酸酶结构域，一个双链结合结构域。研究表明 PAZ 结构域含有与 ssRNA 的 3′端互作的结构，这个结构也可以让 PAZ 结构域与含有 2 个核苷酸长度的 3′突出端的双链 RNA 相作用。成熟的miRNA有 21～25 核苷酸的长度变化，这个变化范围可能是由于 pre-miRNA 茎的错配和突环造成的。

在植物细胞中没有与动物细胞中 Drosha 同源的蛋白，但是植物细胞中的 Dicer 家族却非常复杂。在拟南芥中有 4 种 Dicer 酶，DCL1，DCL2，DCL3 和 DCL4，其中 DCL1 和 DCL4 含有细胞核定位信号肽。因此，动物细胞中 Drosha 的功能在植物中可能由其他的 Dicer 酶来完成。DCL1 含有 2 个细胞核定位信号，如果植物细胞的 DCL1 有缺陷，则形成的成熟 miRNA 大大下降，但是可以检测到大量的 pre-miRNA 的积累。因此，植物细胞中 miRNA 可以在细胞核中形成。同时，在植物细胞中复杂的 Dicer 酶组成，还解释了植物细胞中 siRNA 的复杂性。在植物细胞中，存在 2 种 siRNA，一种是 21～22nt，一种是约 25nt 大小。可能不同的 Dicer 酶可以各自产生特异性 siRNA。

不同 Dicer 酶具有不同功能的推测在许多生物细胞中得到了证实。在果蝇中有 2 种 Dicer 酶，Dicer1 的突变阻止了 pre-miRNA 的加工过程，但是 Dicer2 的缺失影响 siRNA 的产生，而不影响 miRNA 的成熟。这些研究结果与 PAZ 结构域只存在于 Dicer1 中，而 Dicer2中没有，PAZ 结构可以识别 pre-miRNA 的末端且介导其裂解的模型相一致。

8.2 RNAi 过程中小 RNA 的鉴定

虽然 RNAi 途径在真核生物细胞中比较保守，但是在不同的生物中也遇到了不同来源的 dsRNA 和不同的效应复合体。效应复合体一般有一条单链小 RNA 与 Argonaute（Ago）蛋白家族的成员结合。Ago 蛋白含有核酸内切酶结构域，但只有一部分 Ago 蛋白有催化活性并介导 RNA 的裂解。还有其他的 Ago 蛋白具有另外一些序列特异性调节过程，如转录水平和翻译水平的基因沉默。当然中心效应复合体还要结合其他蛋白组分，才能完成裂解 RNA 过程。

8.2.1　小 RNA 的种类

小 RNA 的种类主要有：①miRNAs：miRNA 在动植物细胞中广泛存在。在植物细胞中，miRNA 指导 mRNA 的裂解，而且序列保守的靶序列也可以通过生物信息学工具进行鉴定。而在动物细胞中，miRNA 主要与 mRNA 的 3′-非翻译区的保守序列相结合；②rasiRNAs：重复相关序列小干扰 RNA(repeat-associated small interfering RNAs，rasiRNAs)，据推测是源于转座子的正义和反义转录本通过退火而形成 dsRNA。rasiRNA 的特点在于其长度与一般小 RNA 不同。在植物细胞中，miRNA 和 siRNA 的长度是 21nt，而 rasiRNA 是 24nt。而在单细胞真核生物如裂殖酵母中，rasiRNA 是 24～24nt，主要与异染色质的形成有关；③siRNAs：siRNA 既可以是内源的，也可能是通过转基因表达而形成，但是内源的 siRNA 非常少，或者不存在。在植物细胞中还有所谓的 tasiRNA，其来源是特异的 miRNA 与单链的非编码 RNA 转录本结合而被 Dicer 酶裂解形成的 21nt 的小 RNA，进而可以降解具有互补序列的 mRNA；④tncRNAs：只存在线虫中，是一类非编码小 RNA(Tiny non-coding RNAs，tncRNAs)，其功能并不明。

8.2.2　检测和鉴定小 RNA 的方法

主要有 2 类方法来研究小 RNA：一种是检测已知的小 RNA 的表达，采用的是杂交的方法；另一种是克隆的方法，用以获得小 RNA 的直接序列信息。另外，生物信息学用于预测 RNAi 的作用靶点基因，这些数据需要试验证实。用以检测的材料可以是总 RNA，或者是一定核酸长度范围内的总 RNA，一般可以采用标准的 Trizol 法提取。如果是用以克隆或者芯片操作，则需要提取一定核酸长度范围内的 RNA，这样的 RNA 需要通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离提纯。在含有聚乙二醇 8000 和氯化钠的缓冲液中通过沉淀，可以去除大片段的 RNA 和 rRNA。其他方法还有如过硅化柱等，也可以得到相应的 RNA。

8.2.2.1　杂交检测方法

(1) Northern 杂交：聚丙烯酰胺凝胶电泳接着进行 Northern 杂交，提供了一个简洁可信的方法检测小 RNA。Northern 杂交还提供了检测 RNA 片段的大小信息，对于区分不同类型的小 RNA 非常重要。用来杂交的探针是目的基因，可以是部分，也可以是全长。用于杂交的 RNA 的量在 5～50μg，如果是检测大量的 miRNA，用量可以少于 5μg。Northern 杂交还是一种定量检测小 RNA 的方法。通过将已知浓度的小 RNA 稀释成浓度梯度，并与样品进行平行杂交，则可以根据信号的强弱绘制标准曲线。样品的杂交信号强度与标准曲线对照，就可以查到相应信号强度下的小 RNA 的量。这个方法已经用在了许多 miRNA 的定量检测上。

(2) RNA 酶保护实验：采用放射性标记反义转录本液体杂交检测的方法也可以检测小 RNA。过量的放射性标记的非配对探针和非配对的单链片段在液体条件下形成双链，然后用 RNA 酶处理，则非配对区被降解，而双链区保存。然后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并定量。要检测产生 siRNA 的大片段 dsRNA，可以用超过 siRNA 几百 nt 的片段作为探针。由于 RNA 酶处理后产生的片段有一定范围，通过 RNA 酶保护实验检测到的 RNA 的量不

如 Northern 杂交定量准确，但其灵敏度是可以与 Northern 杂交的结果相比较。

(3) 引物延伸法：引物延伸法也是一个以液体杂交为基础的检测方法，但是只能检测明确的小 RNA 片段，如从已知的发夹结构上产生的小 RNA。经过放射性标记的比 siRNA 还要小几个核苷酸的 DNA 探针与小 RNA 退火结合，然后以此为模板，在反转录酶的作用下延伸。延伸产物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳与没有延伸的探针分离而进行检测。

(4) 反转录 PCR：此方法可以用于检测 miRNA 的前体。有些商品化的试剂盒采用设计套索状引物添加通用引物序列，也可以用于成熟 miRNA 的检测。通用引物序列用于后续的 PCR 扩增。这种方法所需的 RNA 的量少，仅纳克级的总 RNA 即可。

(5) miRNA 芯片：芯片方法是一个快速但是需要高技术含量的方法。芯片做成后，检测样品需要进行生物素标记。直接标记有化学法和酶法 2 种。间接标记法有反转录和 PCR 法。总的来讲，有效地直接标记方法简单省时，miRNA 的用量少，100 至几万个分子就足够了。由于不同实验室采用的标记方法不尽相同，当前的许多方法还很难评估来自不同研究组的芯片数据的质量，也就很难评价芯片方法的优缺点。如果不同实验室都采用相同的对照，将对这种现状有所改善。

(6) 原位杂交：此方法虽然广泛用于检测不同组织中的小 RNA，但是由于小 RNA 的长度限制，目前这些方法还不完善。由于原位杂交的部位还有许多杂质影响杂交效果，而且由于 RNA 本身的不稳定，在洗涤步骤中经常出现问题。但是，由于其检测的目的性很明确，还是有许多研究应用这个方法。

8.2.2.2 小 RNA 的克隆

(1) 构建小 RNA 的 cDNA 文库并测序：目前所知的 miRNA 主要是通过克隆鉴定的，而且也是发现新的小 RNA 的主要方法。用于 RNAi 的小 RNA 的结构是 5′端含有磷酸而 3′端含有羟基，而其他 RNA 酶产生的水解产物往往是 5′端含有羟基并含有 2′,3′磷酸环化或者 2′,3′单磷酸。虽然这些结构特点可以用以区分不同的小 RNA，但是在细胞中，小 RNA 在进入 RNAi 途径前会被其他修饰酶修饰(如激酶、磷酸化酶、甲基化酶等)。小 RNA 的命运并不清楚，因为它们在与蛋白(如 Ago)结合之前，就可能被迅速降解。不同细胞类型或者不同物种中 RNAi 的变化也会影响小 RNA 的克隆过程。

整个小 RNA 的克隆过程需要许多步骤，一般的过程包括在小 RNA 的 2 端加上接头，然后反转录形成 cDNA，再通过 PCR 富集片段，再克隆到载体上进行测序。RNA 起始浓度最低 10μg，常用的浓度一般要达到 200μg。用于连接接头的酶主要有：T4 RNA 连接酶 1 (Rnl1)用于催化接头与小 RNA 的连接；以及 Rnl2(1-249)(T4 RNA 连接酶 2 大片段)。T4 RNA 连接酶可以催化 RNA 的 5′端的磷酸和 3′端含有的羟基结合而环化，从而影响接头的连接。防止此问题的主要对策有：3′接头的 3′端通过化学处理使其含有不完整的核苷酸而阻断此末端与其他片段 5′端的结合；小 RNA 去磷酸化以防止自身环化；3′接头结合到小 RNA 上后再在 5′端加上腺苷酸从而在连接中不加 ATP 而降低环化效率。使用 Rnl2 也可以减少小 RNA 的自身环化。加入 3′端接头后，经过聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化，再进行 5′端接头的连接。此时小 RNA 如果是 5′端被去磷酸化的，则必须进行 5′端磷酸化。

加入接头的小 RNA 可以用与接头结合的引物，在反转录酶的作用下，经过反转录形成 cDNA。然后用与接头结合的通用引物(一条与反转录引物互补)进行 PCR 扩增，PCR 产物克隆到载体上，构建成 cDNA 文库，再进行测序。PCR 片段是含有多个片段的混合物，不能

直接用于测序。

（2）小 RNA 文库数据的分析与解释：为了明确克隆到的小 RNA 的功能，所测定的序列首先要和基因组序列进行比对。一般来讲，构建的文库中有一半左右的克隆是属于siRNA或者 miRNA。根据基因组注释的程度，与 RNAi 有关的小 RNA 可以与大量的结构 RNA 如 rRNAs，tRNAs，snRNAs，snoRNAs，or mRNA 区别开来。其主要特点是：长度大小在 21～24bp 之间；5′端绝大多数不变，为尿嘧啶核苷酸，而 3′端变化很大；在 miRNA 两侧的基因组序列包含高度互补的 20～30nt 的片段；miRNA 前体序列具有形成套索状结构的特征。由于 Dicer 酶的催化产物裂解很快，所以大片段的 mRNA 被裂解成许多小 RNA，因而独立的 siRNA 或者 rasiRNA 的频率很低，多是单个克隆。因此，为了尽可能地了解功能性 siRNA 或 rasiRNA，需要进一步改进克隆方法，增加克隆效率，提高克隆频率（图 11-9）。

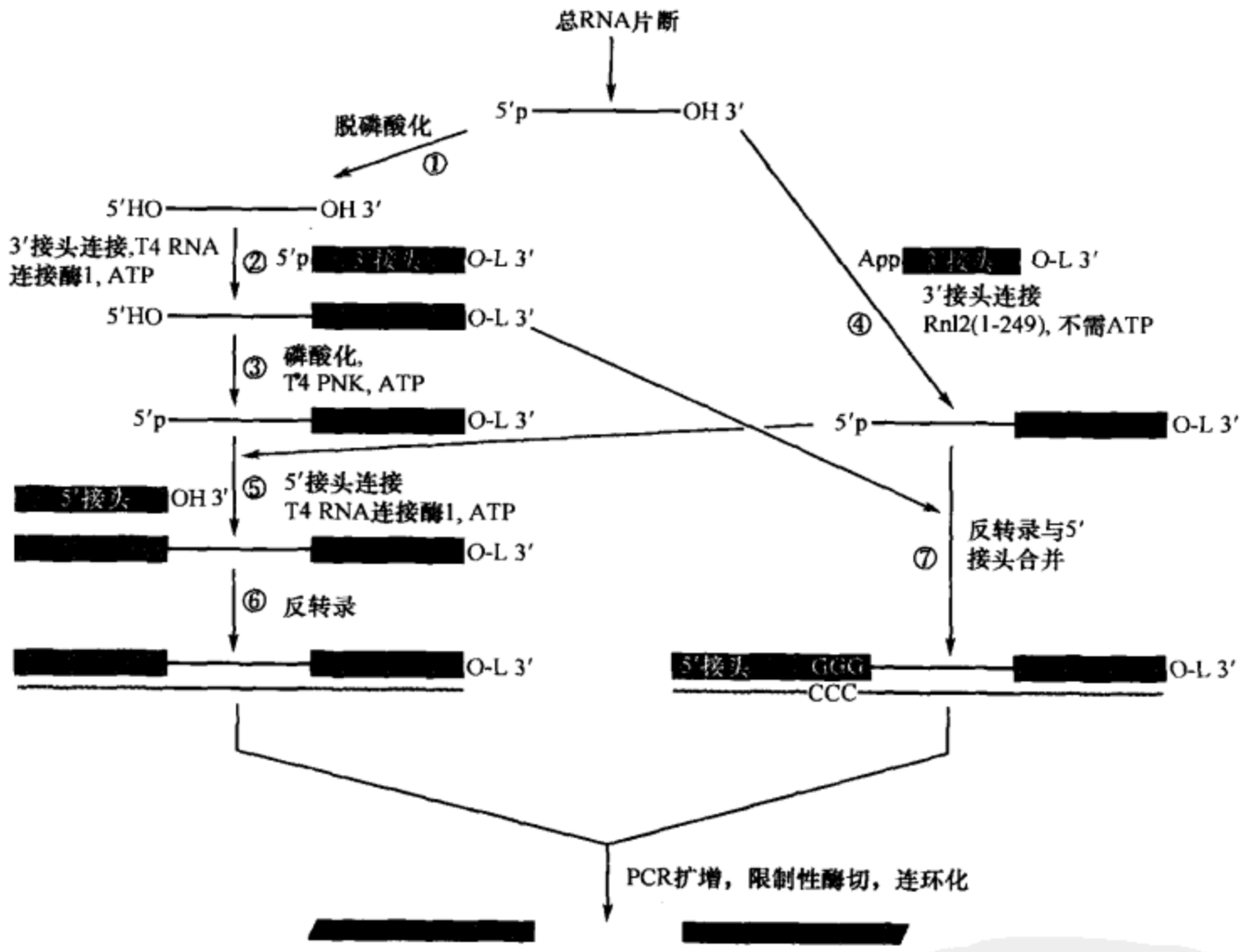


图 11-9　小 RNA 的克隆流程（引自 Aravin et al.，2005）

8.3　真菌中 RNAi 涉及的酶系统的特点

RNAi 途径及其作用在脉胞霉真菌中研究最多，其他真菌中的研究较少。但是应用 RNAi 机制进行基因功能分析的研究却在真菌中广泛应用，并观察到与动植物细胞中相似的转录后水平的表达抑制作用。随着真菌基因组全序列测序研究的快速发展，在重要模式真菌的基因组水平上大规模分析真菌 RNAi 途径涉及的酶组分非常方便。随着动植物细胞中 RNAi 机制的深入研究，通过同源比较，真菌中 RNAi 途径涉及的成分也逐渐被鉴定出来。研究表明，在子囊菌、担子菌、接合菌以及卵菌的基因组中，都存在 RNA 干涉相关酶系的成分，如 RdRP-，

PPD-以及类似 Dicer 蛋白等酶系组分等。但也有一些种类，如在芽殖酵母类的真菌（*Schizosaccharomyces cescerevisiae*、*Saccharomyces castelli*）、假丝酵母种（*Candida guilliermondii* 和 *C. lusitaniae*）以及玉米黑粉菌（*Ustilago maydis*）的基因组中，就没有 RNA 干涉相关酶系的成分。但是，这些生物细胞中并不是没有 siRNA。在芽殖酵母（*Saccharomyces castelli*）中，存在与动植物 Dicer 酶不同的可以裂解双链 RNA 的酶，与 Dicer 酶部分同源，称为 Dcr1。与通常的 Dicer 酶相比，Dcr1 酶只含有 1 个Ⅲ型核酸酶结构域，缺乏 PAZ 结构域，却有 1 个 dsRNA 结合结构域。而在 Saccharomyces castelli 细胞中，也存在大量的 23nt 的小 RNA。据推测，这些小 RNA 的功能是钝化转座子，从而使基因组结构更加稳定。这也从另一方面说明，RNAi 途径是经进化而来，这些生物中 RNAi 途径相关酶系的缺乏是这些生物缺乏正向选择压力下进化的结果，或者是负选择压力的适应结果。

RNA 干涉相关酶系的成分在不同类型的真菌中变化也较大。在子囊菌的脉胞酶（*Neurospora crassa*）基因组中，RNAi 途径的相关成分较多，有 3 个 RdRP（RNA dependent RNA polymerase (RdRP)）同源序列，2 个 PPD[piwi-PAZ domain (PPD 或 Argonaute)]同源序列和 2 个 Dicer 酶同源序列。而米曲霉中只有 1 个 PPD 蛋白和 1 个 Dicer 同源序列，芽殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）中也只有 1 个 PPD 蛋白、1 个 Dicer 同源序列和 1 个 RdRP 同源序列，其他酶的同源序列缺失。但是在 *S. pombe* 中，可能含有骨干沉默成分，其他真菌中的酶成分是由他们复制或者歧化而来。不同真菌中的 RNA 干涉相关酶系的成分的系统发育关系分析表明，它们有共同的起源，但分化比较大，在长期进化过程中发生了岐化。在镰刀菌（*Fusarium graminearum*）中，1 个基因与脉胞霉的 RdRP 同源，而 3 个与 PPD 同源。在稻瘟病菌中也有类似的情况，说明不同生物之间的 RNA 干涉具有相似的分子基础，RNA 干涉在进化上比较保守。在担子菌中，至少有 2 个类型的 Dicer 酶，3 个 RdRP，2 个 PPD，担子菌和子囊菌的 RNA 干涉相关酶类是由同一家族的酶进化而来，但是担子菌中的 RNAi 酶系比子囊菌中的情况要复杂。最近的研究表明，真菌的 RNAi 途径与真菌抗真菌病毒有关，而这在动植物中已经明确，这进一步显示了 RNAi 在真菌、动物和植物中具有共同的生理功能。

8.4 真菌中利用 RNAi 研究基因功能的进展

在真菌细胞中，siRNA 途径已经被证实存在，而 miRNA 途径目前在真菌中还没有发现。但并不意味着真菌中没有小 RNA。最早在真菌中发现的小 RNA 对基因表达的抑制现象是在粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*）中发现的，外源导入基因可以抑制与其有同源序列的内源基因的表达，而将此现象称为基因压制（gene quelling）现象。随着 RNAi 在动植物细胞中研究的深入和其机制的揭示，人们认识到真菌中的 quelling 与植物中的基因沉默现象机制基本相同。真菌中的基因压制现象、植物中的基因沉默现象和动物中的基因干扰现象的产生有相同的产生机制，从而真菌中这些现象也逐渐统一称为 RNA 干涉（RNAi）。

8.4.1 真菌中 RNAi 的不同途径

在模式丝状真菌粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*）的研究中，发现其细胞中存在由小 RNA 引起的基因表达的抑制作用，分别有基因压制（gene quelling）和减数分裂沉默（MSUD）2 种不同的途径，调节细胞的发育。基因压制发生在营养菌丝中，而减数分裂沉

默发生在有性生殖阶段。

真菌粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中发现的基因压制(gene quelling)是最早在真菌中发现的基因沉默现象。在野生型粗糙脉孢菌中转入类胡萝卜素基因 *al*-1,部分转化子中目的基因的表达水平剧烈降低,抑制作用同时作用于内源基因和外源基因,抑制作用是发生在转录后水平上。基因沉默的水平是由外源转化基因的编码区引起,基因的启动子区没有作用。基因压制作用发生在营养菌丝生长过程中,基因表达的抑制作用还伴随着 DNA 甲基化过程,这与 RNAi 在一般情况下不同。通过对粗糙脉孢菌(*N. crassa*)压制缺陷突变体的研究,发现基因压制作用需要 RNAi 途径的相关酶系参与,目的基因表达的抑制作用与依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase,RdRP)有关,说明基因压制途径与典型的 RNAi 类似。但是,其中的有些酶还参与其他细胞分化过程。

粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中另一种基因沉默现象发生在有性过程中,称为减数分裂沉默(Meiotic silencing by unpaired DNA ,MSUD)。在有性生殖过程中,2 个单核菌丝交配,形成一个短暂的双倍体菌丝阶段即合子。合子进行减数分裂,此过程涉及同源染色体配对等过程。减数分裂后还有一次有丝分裂,然后在子囊中形成子囊孢子。MSUD 导致同源染色体上一方基因沉默,但不影响另一方染色体,从而导致同源染色体不能正常配对而减数分裂结构异常,其结果是只产生了野生型菌株一半的子囊孢子。这个过程发生在染色体配对到子囊孢子形成的短暂时期。MSUD 与 RNAi 联系起来是在研究 MSUD 抑制突变体过程中发现的。RNAi 途径的多个酶参与了 MSUD 过程,RNAi 信号途径也参与了这个过程。有性时期的 RNAi 现象也在动物细胞的生殖阶段发现,说明这也是非常古老的保守途径。但是还有 RNAi 酶系以外的蛋白成分参与 MSUD 和 Quelling 过程,说明真菌中存在不同于一般 RNAi 的抑制途径。

8.4.2　RNAi 与芽殖酵母中异染色质

RNAi 途径不但可以引起转录后基因沉默,而且还可以引起转录水平的基因沉默。RNAi 途径可以引起 DNA 或者组氨酸的修饰,导致所谓异染色质的抑制性染色质结构的组装。此过程限制了不需要的基因重组和重复序列如转座子的移动,因而在基因组的稳定性方面有重要作用。染色体的正常分离也需要 RNAi 介导的异染色质的形成,RNAi 途径能够促进细胞分裂时结合染色体的形成,促进姊妹染色体在着丝点区域的结合。RNAi 途径还指导抑制性染色质形成或 DNA 的修饰,此过程在果蝇、动物和植物中高度保守。

裂殖酵母的异染色质一般存在于着丝点、端粒和交配型区域。着丝点区域的 DNA 大小约 35～110kb。其中心区域(cnt)有 1 个独特的 DNA 序列,旁边有 2 个类型的重复 DNA 序列,称为内板重复序列(imr)和外部重复序列(otr)。otr 区域也有 2 个类型的重复序列,称为 dg 和 dh 重复区。裂殖酵母中 RNAi 途径的每步关键酶都只有 1 个:1 个 Dicer 酶催化形成 siRNA;1 个 Argonaute (Agol)蛋白,与 siRNA 结合;1 个 RNA 指导的 RNA 聚合酶,以 RNA 为模板合成双链 RNA(dsRNA)。RNAi 途径的任何一个酶的缺失突变都导致着丝点区域没有异染色质,并伴随有来自 dg/dh 区的正义和反义转录本的积累。交配型区域位点的 DNA 序列与 dg/dh 区的部分同源性达到 96%。但是和着丝点不同,只有在交配型区域的其他基因也突变的情况下,RNAi 才影响异染色质的形成。这说明交配型区域异染色体的形成需要 2 个途径,一个依赖 RNAi 的途径,另一个是独立于 RNAi 的其他途径。这

种情况也发生在端粒区域。总的来说，裂殖酵母基因组的 3 个区域的异染色质的形成与 RNAi 有关，但交配型区域和端粒区域与着丝点区域不同，是在缺乏 RNAi 时形成异染色质。另外，与端粒紧密连接的核糖体基因，是一个 RNAi 的靶点。RNAi 还可以引起组氨酸的甲基化，从而对基因的表达起到调节作用。

8.4.3 RNAi 发卡结构表达载体应用于真菌基因功能研究

利用真菌细胞中 RNAi 的机制可以研究目的基因的功能。虽然也有直接对真菌饲喂 siRNA 诱导基因沉默的研究报道，但是通过构建整合载体诱导基因沉默是真菌中 RNAi 研究的主要方式。根据目的基因的序列信息和结构特点，在体外构建可以转录形成双链 RNA 的载体，导入细胞后，则可引发目的基因的 mRNA 降解，从而高效抑制目的基因的表达。

虽然用目的基因编码区构建的 quelling 载体已经证明是有效的 RNAi 载体，但是研究发现利用构建可以诱发 RNAi 的发夹结构载体，即 hpRNA(hairpin RNA)表达载体，诱发基因沉默的效率更高。其基本特点是将目的基因的片段正反向连接到 1 个真菌启动子下，转化真菌，使载体整合到真菌的基因组中，在真菌启动子的调控下，转录形成 mRNA。由于形成的目的 mRNA 具有反向重复序列，则自身的不同片段之间具有互补序列顺序，可自动结合形成含有发夹结构的双链 RNA。通过构建载体诱导 hpRNA 表达是目前广泛应用的一种在真菌中诱发 RNAi 的方法。在 hpRNA 表达载体的基础上，又发展了一种更为高效的 ihpRNA(intron-hpRNA)表达载体，即 ihpRNA 表达载体以靶基因的反向重复序列为发夹结构的两臂，两臂之间由真菌的内含子相连。这些载体在真菌及鞭毛菌和黏菌等类真菌中的成功应用，充分证明了 RNAi 技术可以研究真菌基因功能。2002 年 Liu 等人在研究担子菌酵母新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)中，首先将 hpRNA 表达载体应用于真菌的基因沉默研究。Liu 等人将目的基因的两个臂反向连接，中间以 GFP 作为间隔，构建了可以转录形成发夹结构的双链 RNA 的载体，以便使基因在转录后形成发卡结构，转化新型隐球菌，结果显示表现完全突变表型的转化子占 7%～10%。

在稻瘟病菌中，以载体 pSilent-1 为基础，用 ihpRNA 表达载体研究丝状真菌基因功能，干涉稻瘟病菌基因 *MPG1*，沉默效率可达 70%～90%，完全突变表型占 10%～50%，沉默效率明显提高。由于含有潮霉素抗性基因、多克隆位点和内含子间隔区，使载体构建步骤大大简化，pSilent-1 载体成为 ihpRNA 表达载体构建的有效工具(图 11-10)。此后，Krajaejun 等人又发展了以 pFANTAi4 载体为基础的 ihpRNA 表达载体，利用 Gateway 技术和绿色荧光蛋白标记技术研究人类病原菌皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)，结果表明此表达载体同样有很高的沉默效率，

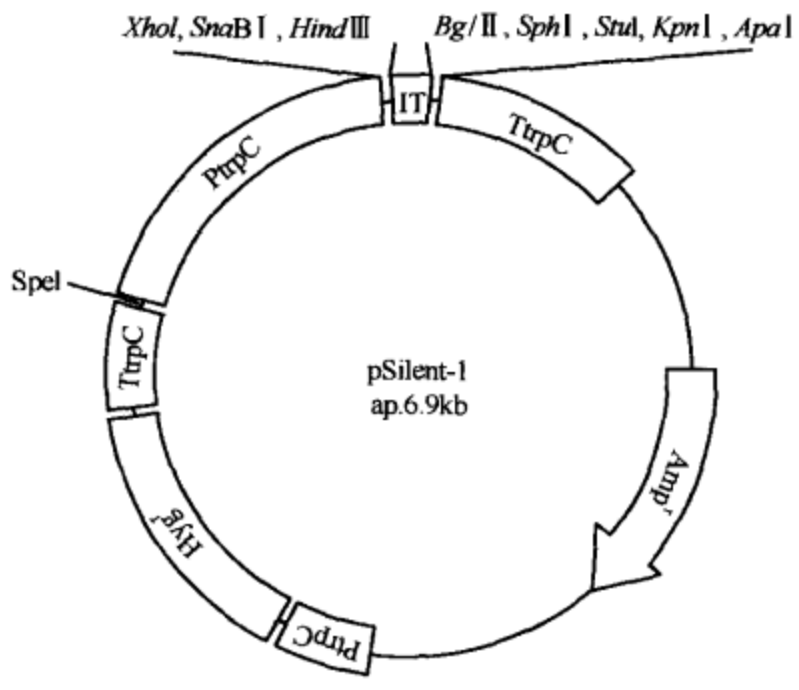


图 11-10 用于稻瘟病菌 RNAi 研究的 pSilent-1 载体
(引自 Nakayashiki et al.，2005)

载体构建不用酶切，简化了克隆步骤。此外，在灰盖鬼伞（*Coprinus cinereus*）、裂褶菌（*Schizophyllum commun*）、高山被孢霉（*Mortierella alpina*）、稻平脐蠕孢（*Bipolaris oryzae*）、皮炎芽生菌（*Blastomyces dermatitidis*）等多种真菌的基因功能研究中，ihpRNA 表达载体得到广泛应用，成为在真菌基因功能研究中成熟的技术。此后，hpRNA 表达载体诱导的 RNA 沉默技术在真菌基因功能研究中被广泛迅速地应用，在包括烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）、黄曲霉（*Aspergillus flavus*）、黑星病菌（*Venturia inaqualis*）、荚膜组织胞浆菌（*Histoplasma capsulatum*）、寄生曲霉（*Aspergillus parasiticus*）等许多真菌中开展了研究。

8.4.4　双启动子反向构建的 RNAi 载体系统应用于真菌基因功能研究

构建 ihpRNA 表达载体至少需要 2 步：将目的基因的编码序列克隆 2 次，然后连接到 ihpRNA 载体中，单酶切插入的要确定方向，以筛选到插入方向正确的载体。如果要以 RNAi 技术研究大量不同基因的功能，工作量很大，因而限制了 ihpRNA 载体的应用。高通量 RNAi 载体的构建研究要求迫切，研究进展也很快。目前已 2 种高通量 RNAi 载体得到应用。一是使用 Gateway 技术，在 ihpRNA 载体上添加特异性重组酶的识别序列，并反向连接 2 个相同的启动子（RNA 聚合酶Ⅱ的启动子），目的基因的同源序列通过 PCR 扩增之后，可以直接连接到载体中，而无需常规的酶切-连接克隆过程。这种载体已经在 *Histoplasma capsulatum*，*Magnaporthe oryzae* 和 *C. neoformans* 等真菌基因功能分析中得到应用。另外是将 2 个不同的启动子反向连接到载体上，中间是多克隆位点，构建形成含有反向双启动子系统的 RNAi 载体。在这个系统中，靶基因的正义和反义 RNA 在 2 个反向启动子的作用下独立进行转录。2 个转录本在细胞中可以自身互补配对，形成双链 RNA。因此，采用反向-双启动子系统的载体构建目的基因的 RNAi 载体只需一次连接且不必考虑插入片段的方向，载体构建简单，对大量基因的 RNAi 研究非常方便。pSD1（pSilent-Daul1）载体即是这种结构（图 11-11）。其结构特点是含有两个方向相反的启动子，即 TrpC 启动子（the tryptophan synthetase）和 gpdA 启动子（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）。日本科学家 Nguyen 等人将绿色荧光蛋白（eGFP）基因插在多克隆位点之前，则靶基因与 GFP 基因将共转录。当用这样的载体转化含有 GFP 的菌株时，目的基因和 GFP 将形成双干涉，转化子可以通过观察绿色荧光是否减弱来直接初筛，简化了对大量转化子的筛选工作。但此类载体的沉默效率要比 ihpRNA 表达载体低。但是少量转化子中的基因表达抑制率较高，研究结果表明沉默效率为 80%。他们应用 pSD1 系统研究稻瘟病菌的 37 个钙离子信号相关基因，并分析各个基因在该菌的生长、附着胞分化和致病性方面的作用进展。共抑制现象也在其他真菌如 *Cryptococcus neoformans*，*Ven-*

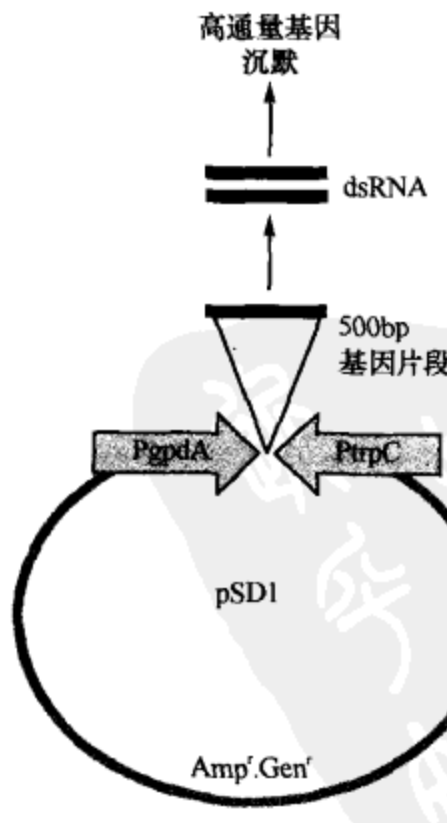


图 11-11　双启动子反向构建的 RNAi 载体
（引自 Caracuel-Rios et al.，2008）

turia inaequalis, *Acremonium chrysogenum* 及 *Blastomyces dermatitidis* 中得到证实，许多基因沉默转化子表现了与该基因的敲除转化子相同的表型。这些研究表明，这样的载体可以用于高通量的研究真菌的基因功能，为大规模确定基因的功能提供了技术支持。

8.5 RNAi 在真菌基因功能研究中的优点和不足

作为一种分子遗传学研究的方法，与其他传统基因功能分析如基因敲除等技术相比，RNAi 技术有其优势也有缺陷：

首先，RNAi 产生的后果是基因表达的抑制，而不是完全缺失。在真菌的关键基因功能研究方面，由于这些关键基因多是致死基因，采用其他方法研究其功能将很困难，而 RNAi 技术将显示其独特的作用。这对于致死基因的研究来讲，RNAi 是个很有用的方法，简单易行，效果明显。但是，由于不同转化子中的抑制效率不同，转化子之间可能会表现出不同的表型，从而造成对研究结果的分析表述带来困难；另外，由于 RNAi 产生一系列的表型，这些表型的差异多是由于目的基因的表达量的不同而造成的，这就提供了比基因敲除更多的生物学信息供我们分析，对于一些基因对生长发育重要性的评估等方面非常有用。如在真菌有效药物靶点的筛选方面，通过 RNAi 技术的抑制效率和表型变化的比较，确定备选药靶分子的重要性。可以根据备选药物的作用特点，快速地找到最有效的靶基因。

另外，RNAi 技术是序列特异性地抑制基因的表达，而基因敲除是位点特异性的技术。这个特点对多拷贝基因的功能分析具有显著优势，而基因敲除对多拷贝基因的研究非常困难。而 RNAi 技术对多拷贝基因的沉默效应已经得到证实。无论基因多拷贝还是基因家族，也无论是基因簇还是多拷贝分布在多条染色体上，RNAi 都可以起作用。特别是在研究异核体和多核体的真菌中，RNAi 技术将发挥无法替代的作用。选择多拷贝基因中的保守区域构建 RNAi 载体，可以诱导整个基因家族的沉默。当基因冗余会掩盖基因缺失突变体的表型而无法采用敲除时，RNAi 技术优势明显。RNAi 的共抑制现象说明，我们将多个基因的序列片段构建在同一个载体中，实现多个基因的同时沉默，这是其他技术不能完成的。由于 RNAi 对基因的表达抑制发生在细胞质中，对于染色体上重组非常困难的位点的基因功能分析，RNAi 技术也可以完成，而依赖同源重组来完成的基因敲除技术无法完成。在高通量研究基因的功能方面，RNAi 技术已经显示出了很好的潜力。

RNAi 技术的缺陷主要是：RNAi 虽然是序列特异性的，但有时会有“脱靶”现象，对具有部分同源的基因的表达也进行了抑制，这样将对研究结果的分析产生不良影响。对于脱靶的问题，一般认为增加 RNAi 载体上目的基因的长度可以减轻脱靶效应。大片段的双链 RNA 经 Dicer 酶处理后，会产生一系列的 siRNA，而产生脱靶效应的 siRNA 所占的比例会下降，从而减轻脱靶效应。同时，也要求对 RNAi 的转化子表型的分析必须更加仔细。RNAi 载体在基因组中的随机插入可能会直接破坏插入点的基因而影响表型，因此需要多个 RNA 沉默转化子才能充分体现靶基因的功能，RNAi 突变体的表型无法通过重新导入靶基因进行恢复，虽然有采用基因替换的方法进行表型恢复实验，但这个方法的原理与基因敲除相同，难以进行高通量的应用。

8.6 真菌中 RNAi 研究的一般步骤概述

(1) 目的基因片段的克隆。根据所要构建的载体特点和目的基因序列设计特异性引

物，通过 PCR 扩增出 150～600bp 的编码区，引物或者克隆载体上有合适的酶切位点。对于要构建发夹结构的载体，要将 PCR 片段克隆到不同的适合 T-载体上，以便反向重复插入到载体上。对于反向双启动子载体，只克隆 1 次就可以。

(2) RNAi 载体的构建。用相同的合适的限制性酶处理克隆到的目的基因的编码区片段和载体，然后将目的片段连接到载体上，构建成可以转录形成双链 RNA 的载体。

(3) 将构建好的载体用合适的方法转化合适的真菌菌株。

(4) 筛选突变子。

(5) 检测基因沉默强的突变子的基因表达状况。一般采用 Northern 杂交或者实时定量荧光 PCR(real-time PCR，RT-PCR)的方法。由于 RT-PCR 比 Northern 杂交省时省力，简单易行，已经成为常用的检测基因表达状况的定量方法。

(6) 突变子表型分析。对于 RNAi 研究，一般要分析多个突变子的表型，以便获得正确的结果。

(7) 目的基因的替代实验以恢复突变表型分析。从其他生物体中克隆目的基因的同源基因(此基因编码的蛋白质有相同的功能，但不能有 RNAi 载体上产生的 siRNA 的靶点)插入到含有目的基因两侧序列的载体上，转化突变子，使突变子的目的基因通过同源重组被替换掉，从而将突变表型恢复。

8.7　定量 PCR 反应中基因表达状况的计算方法

对于一个定量荧光 PCR 反应，PCR 产物量的积累随时间的变化可以分为 3 个阶段，第一阶段是背景信号期，在此阶段背景信号掩盖了 PCR 产物的信号，我们无法检测到 PCR 产物的积累量。第二阶段是对数生长扩增期，PCR 产物量与 PCR 循环数成正相关关系。第三阶段是平台期，PCR 产物量不再随 PCR 循环数的增加而增长，而是保持基本不变。从背景信号期向对数生长扩增期转变的拐点的 PCR 循环数称为 Ct 值，Ct 值与模板的起始量成负相关关系，起始模板量越大，Ct 值越小。在实际的定量荧光 PCR 过程中，Ct 值是根据定量荧光 PCR 仪的荧光域值来确定，荧光域值是人为设置的一个量，一般可以根据具体实验来调整，一般的确定是根据前 3～15 个 PCR 循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍来确定，当然可以根据具体实验进行相应的调整。Ct 值是指一个定量荧光 PCR 反应中荧光信号达到荧光域值时的 PCR 循环数。

由于 Ct 值是与模板的起始量相关，则可以根据 Ct 值推算模板的起始量，也就是对其进行定量。定量方法有绝对定量和相对定量 2 种方法。对于 RNAi 研究来讲，我们关心的是基因表达的抑制效果，因此要进行相对定量。相对定量一般采用 Livak 和 Schmittgen 介绍的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 来计算。

在定量荧光 PCR 研究过程中，我们需要用一个管家基因的表达量来作为对照，即管家基因的表达应该在 RNAi 突变子和野生型菌株之间是一致的，目的基因的表达量与管家基因的表达量进行对比，则可以推算出目的基因的表达量的差异。则：

在 RNAi 突变子中

$\Delta CT1 = Ct.\ t - Ct.\ r$，其中 Ct. t 是 RNAi 突变子中目的基因表达的 Ct 值，Ct. r 是 RNAi 突变子中管家基因(对照)表达的 Ct 值。

同样在野生型菌株中

ΔCTc= Ct. ct-Ct. cr，其中 Ct. ct 是野生型中目的基因表达的 Ct 值，Ct. cr 是野生型中管家基因(对照)表达的 Ct 值。则

ΔΔCT=ΔCT1-ΔCTc

RNAi 突变子中目的基因相对于野生型中目的基因的表达就可以应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算得出。将定量荧光 PCR 中测得的各个 Ct 值代入上述公式，就可以计算出所需要的结果。

第十二章　丝状真菌分子进化与系统发育分析

1　概述

系统发育是指任何分类单元的起源及进化关系，分子系统学研究的主要任务是利用分子生物学技术来阐明物种之间的历史渊源以及物种之间的亲缘关系，即利用分子进化确定的分子特征来重建生物类群的演化历史（系统树）。分子进化研究和系统发育研究是密切相关并相互促进的，分子进化特征的研究有助于建立正确的系统发育关系，反之，系统发育的建立将更好地理解和研究分子进化的各种特征。

分子系统学研究首先要通过现代分子生物学技术获得物种特定遗传标记的大量数据，然后把这些数据进行相关的数学分析，并对研究结果进行解释和说明。

核酸序列是生物体的基本信息单位，随着核酸序列测定方法的不断改进和完善，核酸序列在分子系统学研究中的地位越来越重要，序列分析已成为研究生物系统发育关系的重要手段。另外，限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）、随机扩增多态性 DNA（random amplified polymorphic DNA，RAPD）、扩增性片段长度多态性（amplified fragment length polymorphism，AFLP）等也常用于系统发育分析。

获得大量的分子数据后，要把这些数据进行相关的数学分析，并对研究结果进行解释和说明。数据分析方法有：①简约（parsimony）法，这种方法旨在确定最短的系统树。从简约性方法中获得有根树的唯一要求是在数据集中包括一个或多个外群，外群在无根树上连接的部位就意味着所有内群的根。直接从性状数据推论系统发育的方法中，简约性方法应用最广。常用方法有最大简约法（maximum parsimony）等。在最大简约法中一般常用 PAUP 软件来构建最简约树，也可用 PHYLIP 软件中的 dnapars 程序来构建简约树。②距离矩阵（distance matrix）法，距离指相对替代率、遗传距离或进化距离，距离矩阵方法要求原始数据以成对分类单元之间的距离形式表示，对于性状数据编码后要转换成距离数据。常用方法有邻接法（neighbor-joining）等。在邻接法中可以应用 clustal W 程序，也可利用 PAUP 软件、PHYLIP 软件包中的 neighbor 程序来构建分子系统树。③似然法（likelihood method），以各种假设的进化数学模型对观测结果进行检验，选出具有最大似然函数的模型构树。常用方法有 Langley Fitch 法和 Felsenstein 法等。

对于系统发育分析过程中可能出现的随机误差常采用重抽样方法来估计，也可采用自举法（bootstrapping）对系统树进行可靠性分析。而选择合适的外群能帮助消除系统发育分析中的系统误差。在简约性方法中如果系统树的分枝较密集，则这些同塑性改变能检测出来。但在长而分枝的支系上同塑性状不易检测，使得对较长分枝的估计产生较大的误差，因而在使用简约性方法进行系统发育分析时应避免与其他分枝差异较大的长分枝，且应选择多个外群，因为外群可使树上最长的分枝变短，消除误差。距离矩阵方法趋向于低估较大的距离，因而如果树上有较多的大距离分类单元将使误差复杂化，因而在用距离矩阵法方法进行系统发育分析时，外群的选择应保持最小的数量。

2 系统发育分析方法

2.1 DNA 序列测定

2.1.1 核糖体和线粒体 rRNA 基因

核糖体(ribosome)是合成蛋白质的工厂,核糖体 RNA(ribosomal RNA,rRNA)是核糖体的重要组成部分,编码 rRNA 的 rRNA 基因(rDNA)广泛存在于一切生物之中。rDNA 是一种中度重复序列,它是由几百个拷贝的基因串联重复形成的。在真核生物中 3 个编码分别是 18S、5.8S 和 28S rDNA,串联形成一个基因簇(gene cluster)。rDNA 的一个重复单位由转录区(transcribed spacer,TS)和非转录区(nontranscribed spacer,NTS)构成。非转录区也称基因间隔区(intergenic spacer,IGS),它将相邻的 2 个重复单位隔开。转录区由 2 个内转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)将 18S、5.8S 和 28S rDNA 分开,此外在 18S rDNA 上游和 28S rDNA 下游还有外转录间隔区(external transcribed spacer,ETS)。真菌的线粒体 DNA(mitochondria DNA,mtDNA)是大小为几十 kb 的环状双链结构,包含有两个 rRNA 基因:16S rRNA 基因和 23S rRNA 基因,其进化速率大约比核糖体 rDNA 快大约 16 倍。rDNA 是高度保守的,且 rDNA 多拷贝、引物位点高度保守,是最容易被扩增及测序的分子,因此是分子系统学研究最常用的核酸分子。但由于其不同区段的保守性不同,因此常利用不同保守性的 rDNA 区段进行不同分类水平的系统发育关系研究,如通过对 SSU rDNA 的序列分析进行真菌界不同门之间的系统发育关系研究,并由此确立属于真菌的子囊菌、担子菌、接合菌及壶菌 4 个门类;而 ITS rDNA 序列分析则适用于亲缘关系较近的种之间的系统发育关系研究,并且不断增长的公共序列数据库中的 ITS 序列数据使得 ITS 作为鉴定分子的价值不断增长,但是 ITS rDNA 序列在亲缘关系非常近的近缘种之间可能缺少变异,因此,有必要选择其他合适的基因进行系统发育的研究。

方案 1 木霉菌的 ITS rDNA 的 PCR 扩增

例 用 ITS1-5.8S-ITS2 片段的通用引物 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)和 ITS5(5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′)扩增木霉菌的 ITS rDNA。操作步骤如下:

1. 基因组 DNA 的提取见第二章。

2. PCR 扩增(1)在 100 μl 反应体系中,依次加入表 12-1 所列成分。

表 12-1 PCR 体系组成成分

体积	成分	体积	成分
59 μl	H_2O	1 μl	50 μmol/L 的引物 ITS4
10 μl	10×PCR 反应缓冲液	1 μl	50 μmol/L 的引物 ITS5
6 μl	25 mmol/L $MgCl_2$	20μl	5 ng/μl 模板 DNA
2μl	10 mmol/L dNTPs	1μl	5 U/μl Taq DNA 聚合酶

(1) 涡旋混匀;

(2) 在 PCR 仪上进行 PCR 反应。按下列反应参数设置：94℃变性 3min，然后为 30 个循环，每个循环在 94℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 30s，30 个循环后，在 72℃延伸 7min，最后在 4℃停止反应。

3. 用 QIAGEN 的 PCR 产物纯化试剂盒(QIAquick PCR 纯化试剂盒)纯化 PCR 扩增产物。纯化后的 PCR 产物—20℃保存备用。

4. 取 2μl 滤液在琼脂糖凝胶中电泳，估算浓度。

5. PCR 纯化产物序列测定。

PCR 纯化产物用扩增引物直接进行双向测序。在本文中，测序用 Pharmacia 公司的 MegaBACE 1 000 DNA 分析系统，按 Pharmacia 公司的 DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 操作说明书进行测序反应，反应体系为 20 μl，引物 1 μl，DYEnamic ET Terminator reagent premix 8 μl，模板 0.2～2 μg，加 ddH_2O 至 20 μl。PCR 反应参数：32 个循环，每轮循环 95℃变性 20s，50℃退火 15s，60℃延伸 1min。

2.1.2　蛋白编码基因

通过单基因进行系统发育关系研究可能存在着主观性，因此通常的做法是对一些独立的、不同的基因序列，特别是蛋白编码基因序列，进行多基因的系统发育关系研究，并通过多基因水平上是否一致以避免上述缺陷。分子进化研究表明，翻译延伸因子(translation elongation factor，tef)基因、RNA 聚合酶Ⅱ(RNA polymerase Ⅱ，RPB2)基因、肌动蛋白(actin)基因和钙调蛋白(calmodulin)基因等是进行系统发育关系研究的有效的靶基因。

方案 2　木霉菌的 tef 1-α 基因的 PCR 扩增

用通用引物 tef1fw(5′-GTGAGCGTGGTATCACCATCG-3′)和 tef1rev(5′-GCCATCCTTGGAGACCAGC-3′)扩增 tef 1-α 基因。操作步骤如下。

1. 基因组 DNA 的提取见第二章。

2. PCR 扩增。

(1) 在 100 μl 反应体系中，加入表 12-2 所列成分。

表 12-2　木霉菌 PCR 扩增 tef 1-α 基因

体积	成分	体积	成分
71.7 μl	H_2O	0.25 μl	50 μmol/L 的引物 tef1fw
10 μl	10×PCR 反应缓冲液	0.25 μl	50 μmol/L 的引物 tef1rev
6 μl	25 mmol/L $MgCl_2$	10 μl	5 ng/μl 模板 DNA
1 μl	10 mmol/L dNTPs	0.8 μl	5 U/μl Taq DNA 聚合酶

(2) 涡旋混匀。

(3) 在 PCR 仪上进行 PCR 反应。按下列反应参数设置：94℃变性 1min，然后为 35 轮循环，每轮循环 94℃变性 1min，59℃退火 1min，74℃延伸 50s，35 轮循环后，在 74℃延伸 7min，最后在 4℃停止反应。

3. PCR 扩增产物纯化同上。

4. PCR 纯化产物序列测定。

2.2 RFLP

限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,RFLP)通过限制性内切酶酶切分析基因组 DNA 的序列变化,其根据是不同生物体的基因组 DNA 在限制性内切酶的酶切位点的碱基发生突变,或酶切位点之间发生了碱基的插入、缺失,导致酶切片段大小发生了变化,这种变化可以通过特定探针杂交进行检测,从而可比较不同生物体 DNA 水平的差异(即多态性),多个探针的比较可以确立生物的进化和分类关系。

RFLP 的缺陷是不同个体的限制性位点很可能相同;识别位点中的任何 1 个碱基发生变化都可以使一个限制性内切酶酶切位点丢失,这些混淆了生物个体间的进化分析。

2.3 RAPD 或 AP-PCR

随机扩增 DNA 多态性(randomly amplified polymorphic DNA,RAPD)或 AP-PCR(arbitrarily primed PCR)是利用随机排列碱基顺序的 10 碱基的寡聚核苷酸单链为引物,对所研究的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,经电泳分离后检测扩增产物 DNA 片段的多态性,如某一 DNA 条带(位点)有变化,即指定其为等位基因,条带在某样品中出现赋值"1",不出现赋值"0"。这种扩增产物 DNA 片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性,从而可以得到相应的 DNA 的遗传、分类和进化等信息。在分子系统学研究中,这种 RAPD 位点数的多少与所能提供系统信息的量及可靠性有明显的关系,通过需要分析多个不同的 RAPD 引物,且获得 RAPD 位点数超过 70 个时,所提供的信息可靠性趋于稳定。

RAPD 技术简单,常常能检测到 RFLP 不能检测到的变异,但 RAPD 的缺陷也是显而易见的。首先是重复性较差,这是由于 PCR 引发区特别是 3′端的碱基替换可阻止引物退火和 PCR 扩增,而只有 1 个碱基的替换即可触发或阻止引发 RAPD 的进行,因此,PCR 任何方面的微小差异也具有同样的效果;即使没有重复性差这一问题,同样电泳迁移率的条带可能不是同源的,缺失的条带也可能不是同源的;而且几乎所有 RAPD 都呈显性遗传,因而在二倍体生物中不可能区分显性杂合子和纯合子基因型。

方案 3 木霉菌进行 RAPD 研究

例 用 6 个随机引物:S6(TGCTCTGCCC)、S7(GGTGACGCAG)、S10(CTGCTGGGAC)、S23(AGTCAGCCACC)、S31(CAATCGCCGT)、S33(CAGCACCCAC)对木霉菌进行 RAPD 研究。其操作步骤如下:

1. 基因组 DNA 的提取见第二章。

2. PCR 扩增。

(1) 在 25 μl 反应体系中,加入表 12-3 所列成分。

表 12-3 木霉菌 RAPD 分析体系组成

体积	成分	体积	成分
15 μl	H_2O	0.25 μl	50 μmol/L 的随机引物
2.5 μl	10×PCR 反应缓冲液	5 μl	5 ng/μl 模板 DNA
1.5 μl	25 mmol/L $MgCl_2$	0.25 μl	5 U/μl Taq DNA 聚合酶
0.5 μl	10 mmol/L dNTPs		

(2) 涡旋混匀。

(3) 在 PCR 仪上进行 PCR 反应。按下列反应参数设置：94℃变性 3min，然后为 40 个循环，每个循环 92℃变性 1min，34℃退火 1min，72℃延伸 501min，40 个循环后，在 72℃延伸 10min，最后在 4℃停止反应。

(4) 取 8 μl 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳分析，分子标记为 GeneRuler™ DNA Ladder Mix(片段长度：10 000、8 000、6 000、5 000、4 000、3 500、3 000、2 500、2 000、1 500、1 200、1 031、900、800、700、600、500、400、300、200、100bp)。

2.4　AFLP

扩增性片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism，AFLP)是一种通过 PCR 扩增检测 DNA 限制性片段的 DNA 指纹技术。它是一种随机扩增技术，但与其他的随机扩增技术相比，AFLP 利用严格的 PCR 条件。扩增引物(AFLP 引物)一般是 17～21 个碱基长，与其靶序列完全退火，接头、限制性位点和临近的限制性位点的小部分序列被作为 AFLP 引物结合位点。这使得 AFLP 技术非常可靠、重复性好，不受扩增参数，如热循环仪、模板浓度等的影响。一个典型的 AFLP 指纹包含 50～100 条扩增片段，其中 80%可作为遗传标记，且 AFLP 标记通常是孟德尔遗传。AFLP 产生的片段来源于基因组不同区域中的大量独立的位点，不需要事先了解 DNA 序列信息及探针的制备，这对于研究只有很少 DNA 信息的生物是特别有利的。因此，与 RFLP、RAPD 相比，AFLP 技术具有无可比拟的优势。

方案 4　AFLP 技术

AFLP 技术通常包括以下步骤(参见第一章方案 3)：

1. 限制性酶切　用 1 对限制性内切酶(1 个六核苷酸内切酶和 1 个四核苷酸内切酶)对 DNA 进行双酶切。

2. 连接　双链接头连接到酶切片段上。

3. 预扩增反应　接头和限制性位点序列作为引物结合位点进行预选择性扩增。

4. 选择性扩增反应　用一套选择性扩增引物进行选择性扩增。

5. 凝胶电泳　扩增产物在聚丙烯酰胺凝胶(测序胶)上电泳。

3　构建系统发育树

目前已发展了很多种以计算机进行系统发育树分析的方法，Clustal W、MEGA、PAUP、PHYLIP、Mrbayes 是进行系统发育发析最常见的几种分析软件。

3.1　DNA 序列分析

DNA 序列用 CLUSTAL X 序列对准，并人工校正。首先用 DNAstar 软件包中的 MegAlign 程序(Clustal 法)计算序列之间的遗传距离，并产生分子系统树。系统发育分析用 PHYLIP 3.57c 软件包中的 SEQBOOT 程序生成自举(bootstrap)数据集，用 DNAPARS 程序构建最简约系统树(有根树)，或用 DNADIST 程序(Kimura 2-parameter 距离)和

NEIGHBOR 程序(Neighbor-joining 法和 UPGMA 法)构建无根树。

3.2 RAPD 分析

电泳胶用美国 UVP 公司的凝胶成像系统 gds-7 500 分析产生电泳图谱。以某一 DNA 片段在某样品中出现赋值“1”,不出现赋值“0”为依据产生二态性状集,用 RAPDistance 程序将扩增片段的二态数据转换成距离数据,计算出的距离矩阵用 PHYLIP 3.57c 程序包中的 NEIGHBOR 程序(UPGMA 法)进行聚类分析。

第十三章　丝状真菌群体遗传分析

物种是以群体形式存在的，群体遗传结构(genetic structure)是指一个物种内总的遗传变异程度及其在群体间的分布模式，它是指群体内个体间具有一定的遗传变异、由时空划分这种变异的方法以及亚群内和亚群间个体系统发育的关系。群体结构可以用来描述亚群之间的遗传变异，通常用基因多样性分析来划分群体内、群体间的多样性，从而推断基因流和遗传漂变；同时依靠群体内遗传变异模式，特别是多位点基因型的变异频率，推断基因间的重组。电泳核型、ITS、RAPD、RFLP、AFLP 等一些分子标记技术广泛应用于丝状真菌群体结构的研究。在稻瘟病菌群体遗传结构分析上常用的是 rep-PCR 和 MGR586 (*M. grisea* repeat，MGR)基因探针的 RFLP 指纹分析等。MGR586-RFLP 和 Pot-rep-PCR 都是利用重复序列在稻瘟病菌基因组上的分布和拷贝数的差异来反应菌株遗传背景的差异，从而得到其群体遗传结构和多样性程度。本章介绍真菌群体遗传研究的主要方法，如利用 MGR586-RFLP 和 Pot2-rep-PCR 指纹分析技术进行稻瘟病菌群体遗传结构和多样性分析及环境中真菌居群的分析方法。

1　纯培养条件下真菌群体遗传分析

每个物种都是由多个群体组成，群体(population，也译作居群)是由众多的个体组成，研究真菌物种的群体结构，可以通过分析群体中具有代表性的菌株的遗传特性来进行。许多真菌可以在人工培养基上纯培养，这样的样品可以从分子和形态角度进行多层次分析研究。

方案 1　Pot2-rep-PCR

1. 菌株的分离和培养　参见第四章。

2. 基因组 DNA 的提取　参见第二章。

3. Rep-PCR 扩增

(1) Pot2-rep-PCR 扩增的前引物 Pot2-1 序列为 5′-CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT-3′，后引物 Pot2-2 序列为 5′-CCCTCATTCGTCACACGTTC-3′。

(2) 在 25 μl 反应体系中，加入表 13-1 所列成分：

表 13-1　Pot2-rep-PCR 的成分

2.5 μl 10×PCR 反应缓冲液	1.25 μl 50 μmol/L 的 Pot2-2
2.0 μl 25 mmol/L $MgCl_2$	0.7 U Taq DNA 聚合酶
2.5 μl 2.5 mmol/L dNTPs	1.5 μg 模板 DNA
1.25 μl 50 μmol/L 的 Pot2-1	ddH_2O 至 25μl

(3) 瞬时离心混匀。

(4) 在 PCR 仪上进行 PCR 反应。按下列反应参数设置：95℃ 变性 2.5min，然后 94℃

变性 1min,62℃退火 1min,65℃延伸 10min,4 个循环;94℃变性 30s,62℃退火 1min,65℃延伸 10min,26 个循环后;最后在 65℃延伸 15min,最后在 4℃停止反应。

(5) PCR 产物用 Synergel 凝胶电泳(0.5% 琼脂糖+0.75% Synergel),0.5×TBE,120V,8.5 h。

(6) 电泳结束后用凝胶成像系统观察、拍照。

4. 数据统计与处理 把电泳照片转换成 2 进制数据,即以 PCR 扩增条带在某样品中出现赋值"1",不出现赋值"0",用 RAPDistance 程序将扩增片段的二态数据转换成距离数据,计算出的距离矩阵用 PHYLIP 程序包中的 NEIGHBOR 程序(UPGMA 法)进行聚类分析。或用 NTSYSpc 程序进行聚类分析。

方案 2 MGR586-RFLP

1. 菌株的分离和培养 参见第四章。

2. 基因组 DNA 的提取 参见第一章。

3. 取 2 μg DNA,用限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ酶解,酶解样品在 0.7%琼脂糖凝胶电泳;用碱性转移法将电泳后的 DNA 转移到尼龙膜上;用地高辛标记的 MGR586 探针与尼龙膜杂交;并检测杂交膜上的信号。具体方法参见第二章。

4. 数据统计与处理 参见方案 1 的数据统计与处理。

2 免培养技术用于环境中真菌群体的遗传结构分析

真菌在自然环境中普遍存在,具有多种环境功能,其群体构成也具有重要的经济意义。自然环境中的许多真菌不能在一般的人工培养基上生长,为采用纯培养技术研究真菌的群体结构带来困难。因此,利用分子生物学技术,对环境中真菌群体结构进行免培养技术分析,为我们研究环境中真菌居群多样性提供了技术支持。

真菌在土壤的碳-氮物质循环中起到非常重要的作用。但与土壤中的细菌居群研究相比,真菌的研究还相当薄弱。而且,以往的研究多是采用实验室培养的方法进行,许多真菌不能培养,因而研究结果受到很大限制。采用非培养方法来研究各种环境中的微生物群落及其动态,越来越受到科学家的重视,如分析环境中 DNA 或 RNA 所代表的物种多样性等,并已经取得了一些很有意义的结果。各种环境中细菌的非培养生物多样性的研究主要通过分析 16S rDNA的多态性来完成。在环境真菌的多样性研究中,越来越多的研究也是靠分析相关基因片段的多态性来进行,其中 16S rDNA 也是应用最多。其中的关键步骤是能够从环境样品中提取出总 DNA,然后通过聚合酶链反应(PCR)将分析所需的 DNA 片段富集分析。

2.1 土壤中 DNA 的直接提取方法对研究结果的影响分析

多种方法可以用于直接从各种土壤样品中提取 DNA,包括一些商品化的试剂盒。提取 DNA 的质量和纯度对后序研究非常重要。土壤中的腐殖酸往往会被一起提取出来,而这些物质往往对 Taq 酶的活性具有抑制作用。为了克服这个问题,往往需要对提取到的 DNA 进行纯化,但过多的纯化步骤又容易使 DNA 提取量过少。因而,在 PCR 体系中要加入 BSA 或者其他的物质以提高 PCR 的质量非常必要。取样的深度也将影响多态性研究的

结果，因为在不同深度的土壤中，真菌的群体分布不同。提取样品的多少也将影响 DNA 提取的质量。一般应用 1～4g 的土壤样品提取 DNA。

2.2　从土壤样品中直接提取 DNA

从土壤中提取 DNA 的策略主要有：机械破碎；机械破碎后用酚抽提；机械破碎后加入 SDS，再加入化学物质如 CTAB 等处理，然后再用酚抽提；还有就是机械破碎后加入 SDS，再加入化学物质如 CTAB 等处理，再加酶处理，然后再用酚抽提。细胞破碎时对样品进行反复冻融也是破碎细胞的常用方法之一。商品化试剂盒也是常用的方法，提取效果一般较好。一般来讲，通过机械破碎后加入 SDS，再加入化学物质如 CTAB 等处理，然后再用酚抽提是常用的比较好的方法，试剂盒也是简单的高效方法。

2.3　用于环境真菌多样性分析的 PCR 引物

虽然在细菌居群动态分析中，16S rDNA 的应用最广泛，但是对于真菌，18S rDNA 的应用却受到很多限制，因为一般认为这个片段的分类信息主要存在于不同的属或者科间。但是在子囊菌和担子菌中，18S rDNA 的数据库显示许多种之间也有明显差异，因此越来越多的环境样品的分析也是针对这个片段。特别是在丛枝菌根的研究中发现，18S rDNA 足以用于分析不同种间的多态性分析，甚至还可以分析种下居群。由于在土壤中的原核生物和其他真核生物的 DNA 被同时提取出来，因此，PCR 引物的设计就非常关键，这些引物必须只能将真菌的相应 DNA 片段扩增出来，而其他生物的 DNA 片段不能扩增出来。而且，扩增真菌的 28S rDNA 片段和 ITS 区的 rDNA 片段的引物也设计出来，并被广泛应用。常用的引物序列见表 13-2。

表 13-2　环境样品中真菌多样性分析的常用 PCR 引物(Anderson et al.，2004)

PCR 引物名称	序列	目的基因片段
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	18S rDNA
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	18S rDNA
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	18S rDNA
NS8	TCCGCAGGTTCACCTACGGA	18S rDNA
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	ITS
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS
ITS4B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	ITS
2234C	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC	ITS
3126T	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	ITS
ITS4A	CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG	ITS
EF3	TCCTCTAAATGACCAAGTTTG	18S rDNA
EF4	GGAAGGGRTGTATTTATTAG	18S rDNA
Fung5	GTAAAAGTCCTGGTTCCCC	18S rDNA
nu-SSU-0817	TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA	18S rDNA
nu-SSU-1196	TCTGGACCTGGTGAGTTTCC	18S rDNA

续表

PCR 引物名称	序列	目的基因片段
nu-SSU-1536	ATTGCAATGCYCTATCCCCA	18S rDNA
FR1	AICCATTCAATCGGTAIT	18S rDNA
FF390	CGATAACGAACGAGACCT	18S rDNA
PN3	CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC	ITS
PN34	TTGCCGCTTCACTCGCCGTT	ITS
Fun18S1	CCATGCATGTCTAAGTWTAA	ITS
Fun18S2	GCTGGCACCAGACTTGCCCTCC	ITS

当然，有些引物对真菌特异性并不是很好，有时也可以扩增植物的 rDNA。因此，许多特异性更强的引物用于环境中真菌的多样性研究，如 ITS1F 和 ITS4B 用于扩增担子菌的 ITS 区片段，ITS1F 和 ITS4 结合扩增的特异性也很强，ITS4A 和 ITS4 结合用于子囊菌的扩增。引物对 EF4/EF3 、EF4/fung5 和 nu-SSU-0817/nu-SSU-1196 用于真菌 18S rDNA 的扩增。nu-SSU-0817/nu-SSU-1196 的扩增片段是 400～500bp，nu-SSU-0817/nu-SSU-1536 的扩增片段是 800bp，EF4/EF3 的扩增片段长度 1.4～1.5kb，ITS1F/ITS4 的扩增片段长度是 500～800bp。

扩增环境样品中的黏菌 18 SrDNA 的特异性引物见表 13-3。

表 13-3 用于扩增黏菌 18S rDNA 的特异性引物(Kamono et al.，2006)

引物名称	序列	位置
phf1b	AAA ACT CAC CAG GTC C[A/G]G AT	1 326-1 345
phr2b	TAC AAA GGG CAG GGA CGC AT	1 772-1 791
phf2	GTC ATG CCC TTA GAT GTT	1 583-1 600
Phf3	CTT CTT AGA CGT ATC AGA GC	1 528-1 547
phr1	GC[C/T] C[C/T]G AT[A/C] CGT CTA AGAAG	1 528-1 547
phr1b	GCC CTG ATG TGT CTA AGA AG	1 528-1 547

注：位置是指在 *Physarum polycephalum* 中的 18S 核糖体基因序列位置。

2.4 用于环境样品中的真菌多样性的分析方法

分析方法主要有变性梯度凝胶电泳(DGGE)、温度梯度变性凝胶电泳(TGGE)、单链构象多态性(SSCP)、末端限制性酶切长度多态性(T-RFLP)、扩增性核糖体基因限制性分析(ARDRA)、扩增性核糖体基因间区分析(ARISA)等。虽然方法各异，但是一些方法分离 DNA 的原理是相似的，如 DGGE 和 TGGE 是根据 DNA 变性行为来区分大小相同但序列不同的 DNA 片段。这个方法多用于快速检测土壤环境中微生物种群的动态变化。末端限制性酶切长度多态性(T-RFLP)包含的遗传信息更加充分，已经成为各种环境中微生物分析的重要分析方法。DGGE/TGGE 等电泳方法的优越性在于，经过电泳检测后，可以对环境中真菌特异的目的片段进行回收、克隆和测序分析，结果可以和许多数据库进行对比而获得更加充分的信息，因而也成为重要的分析方法。其缺陷在于以下方面：①对 PCR 产物的最佳分离效果的片段较小，虽然有的报道也可以得到较长的片段，一般分离片段约 500bp；②虽然采用的染色方法不断改进，对于一些稀有丰度的真菌群体，还是难以进行很好的检测；③分辨率并不是很理

想，有时很相近的多态性片段不能分离的很好，影响下一步回收测序。

这些方法已经在实验室中大量采用，并取得了很好的进展，大大加深了我们对环境真菌群体动态演替的研究。当然，任何一种技术都不能适用所有环境条件下的真菌研究，具体研究时要根据研究目的和靶基因片段的具体情况采用合适的研究方法。而且，对于具体方法而言，在具体研究时，还需要对一些参数进行优化，以便取得可靠的研究结果。

方案 3　土壤真菌 DNA 的直接提取

试剂：

DNA 提取缓冲液：100 mmol/L NaCl，100 mmol/L Tris-HCl，10mmol/L EDTA，1% SDS。

饱和酚/氯仿/异戊醇：25∶24∶1，*V*/*V*，pH 8.0。氯仿/异戊醇∶24∶1，*V*/*V*，pH 8.0。

异丙醇。75%乙醇。

TE：10mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，pH 8.0。

方法与步骤：

1. 取 2g 土壤样品粉碎（玻璃珠高速粉碎法）。

2. 加入 10ml 的 DNA 提取缓冲液，振荡混匀。10 000g 离心 5min。

3. 取上清液于 50ml 离心管中，加入等体积的饱和酚/氯仿/异戊醇，振荡混匀。12 100g 离心 10min。

4. 取上清液于 50ml 离心管中，加入等体积的氯仿/异戊醇，振荡混匀。12 100g 离心 10min。

5. 取上清液于 50ml 离心管中，加入等体积的异丙醇，−20℃静置 1 h。

6. 12 100g 离心 10min。

7. 去上清液，加入 2ml 75%乙醇洗涤 2 次。

8. 无菌操作台上干燥 5min。

9. 加入 100μl TE，溶解 DNA。

方案 4　土壤样品中真菌总 DNA 的提取

试剂：

10%脱脂奶粉溶液（*W*/*V*）：1g 脱脂奶粉加入 10ml 水中，灭菌。

DNA 提取缓冲液：0.3% SDS，140 mmol/L NaCl，50 mmol/L NaAc，pH 5.1。

饱和酚：pH 8.0。

氯仿/异戊醇 24∶1，*V*/*V*。

5mol/L NaCl 溶液。

异丙醇。

75%乙醇。

TE：10mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，pH 8.0。

方法与步骤：

1. 取 2g 土壤样品，在液氮中研磨 5min。

2. 转移到 50ml 离心管中。

3. 在 25ml 水中加入 1ml 脱脂奶粉溶液，混匀，然后加到 2 步的样品中，振荡混匀。

4. 5 000r/min 离心 2min。
5. 取上清液，加入 DNA 提取缓冲液 4ml，振荡混匀。
6. 加入等体积的饱和酚，振荡混匀。12 100g 离心 10min。
7. 取上清液，加入等体积的氯仿/异戊醇，振荡混匀。12 100g 离心 10min。
8. 取上清液，加入 0.1 倍体积的 5mol/L 的 NaCl，轻轻混匀。
9. 加入 0.6 倍体积的异丙醇，－20℃静置 30min。
10. 12 100g 离心 10min。
11. 去上清液，加入 2ml 75%乙醇洗涤 2 次。
12. 无菌操作台上干燥 5min。
13. 加入 100μlTE，溶解 DNA。
14. 以上得到的粗提 DNA 可以进行进一步纯化。

第十四章　真菌分子生物信息学常用软件的使用

1　概述

要统计有多少种生物信息学分析软件是一件很困难得事情，EMBL 曾经有一个数据库专门记录了相关的信息，www. bioinformatics. net 也有一个维护的软件列表，不过目前这两处资源都被废弃了。一般来说，这个数量级基本上在 10^3 左右。与此相对应的是，不同学科、不同领域的研究人员经常使用的分析软件也就那么几种。就算是专业的生物信息学研究者，常用的一般也在几十种左右。

在如此多的选择面前，遵循下面几条原则可以让人事半功倍：

(1) 有许多不同的软件可以用来干同一件事情。某些免费，某些收费，软件价格反映的一般是其用户友好程度，并不能代表其结果的可靠性。况且，很多广泛使用的软件都是免费的。

(2) 使用软件最新的稳定版本。比如 Primer Premier 5 内置的 Clustal 版本是 10 年前的版本，目前 Clustal 已经发展到了 2. 0. 12。虽然说多序列联配算法并没有根本上的改变，但新版本往往修正了许多 bug，添加了许多新的特性。

(3) 使用拥有广泛用户群的软件。一般来说，用户群越大，该软件的 bug 越少，维护的越好，比如说 BLAST。

(4) 需要使用某些新特性时，使用该领域内领先的研究组开发的软件。当然，这样做的风险是因为用户群小，这类软件还没有经过充分的验证，往往 bug 比较多，比较好的做法是双方合作，由软件开发者去做分析测试。

(5) 由于 Windows 的版权和开发人员个人技能等方面的原因，很多功能强大的分析软件并没有提供 Windows 下的图形操作界面(商业软件除外)，或者图形界面下很多参数调节功能并没有提供相应的接口，如 EMBOSS、Primer3、e-PCR 等。此时熟悉命令行操作方式就成为必不可少的技能。

(6) 同样由于版权限制，Windows 并不是一个好的进行生物信息学分析的平台，就算是某些维护良好的商业软件有时也会碰到莫明奇妙的编码问题(当然，是因为用户不当操作造成的)，此时，具备相应得计算机知识是相当重要的。

下面，就对分子生物学研究一般过程所涉及的一些基本知识及常用分析软件按其先后顺序进行介绍。

2　文件格式

生物信息学软件种类繁多，带来的直接后果就是涉及的文件格式也数不胜数。在很多时候，使用者的大部分精力都无可避免的花在了格式校对上。所幸的是，在这数量繁多的格式中，有那么几种是得到广泛支持的：描述序列信息的如 FASTA、EMBL、GenBank；描述

结构信息的如 PDB；Tab 分隔的行文件，如 GFF；描述多序列联配结果的如 ALN、MSF；描述树信息的如 PH、PHB；记录色谱峰图信息的如 ABI、SCF。

从计算机的角度来讲，文件只有 2 类：ASCII 文件和二进制文件。通俗地讲，ASCII 文件就是可以直接用文本编辑程序（如 Microsoft Word、UltraEdit 等）打开阅读的文件；而二进制文件则基本不包含可供人阅读的内容。上面所说的格式里除了 ABI/SCF 是二进制文件外，其余都为 ASCII 文件，也就是说，本章所涉及的软件基本都可以用 Word 或者 Excel 来查看、输入、输出（图 14-1，图 14-2）。

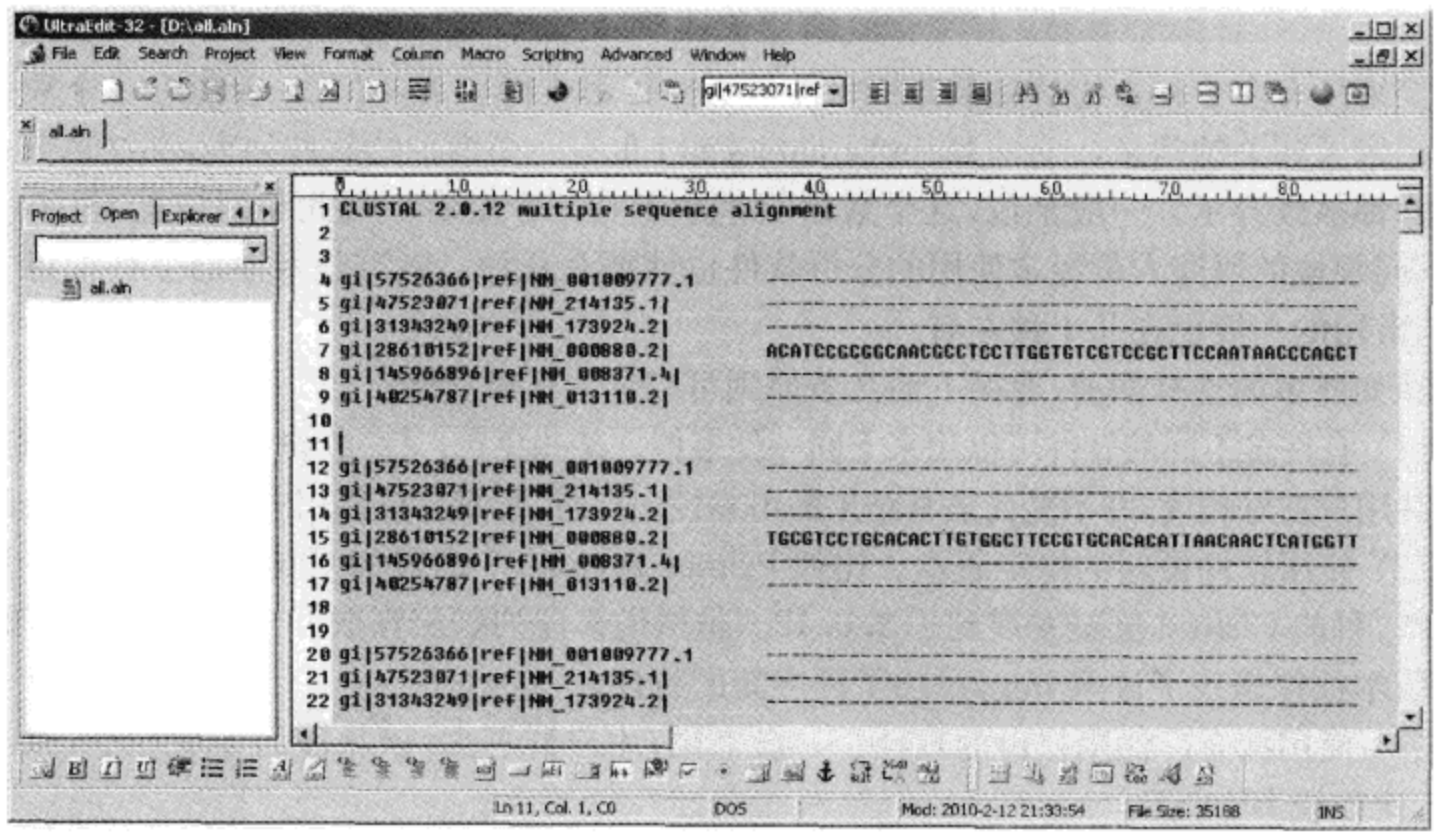


图 14-1　ASCII 文件

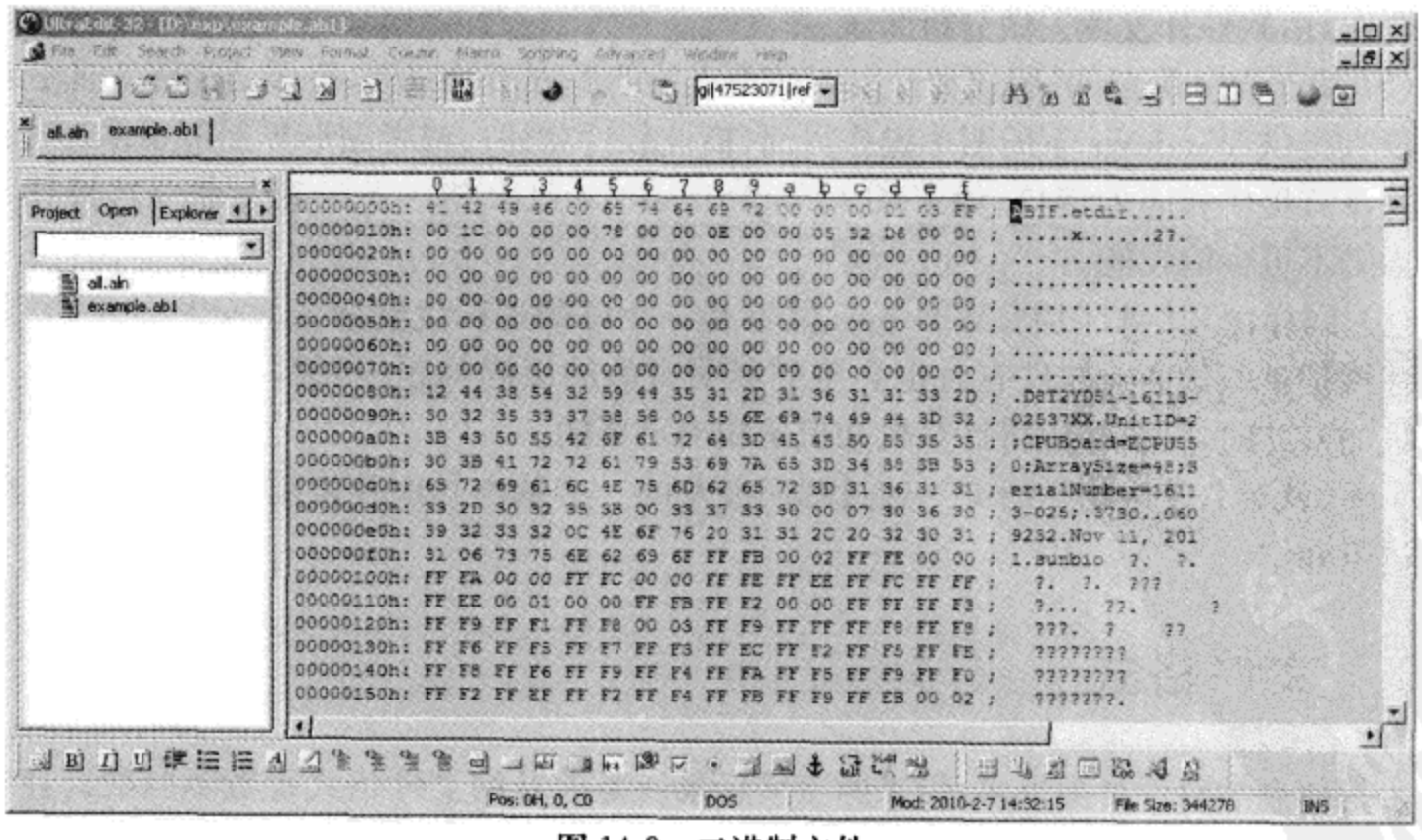


图 14-2　二进制文件

3　FASTA 格式

FASTA 格式又称为 Pearson 格式，是一种用来表示核酸或蛋白序列信息的文本格式，使用单字母编码核苷酸或氨基酸(图 14-3)。

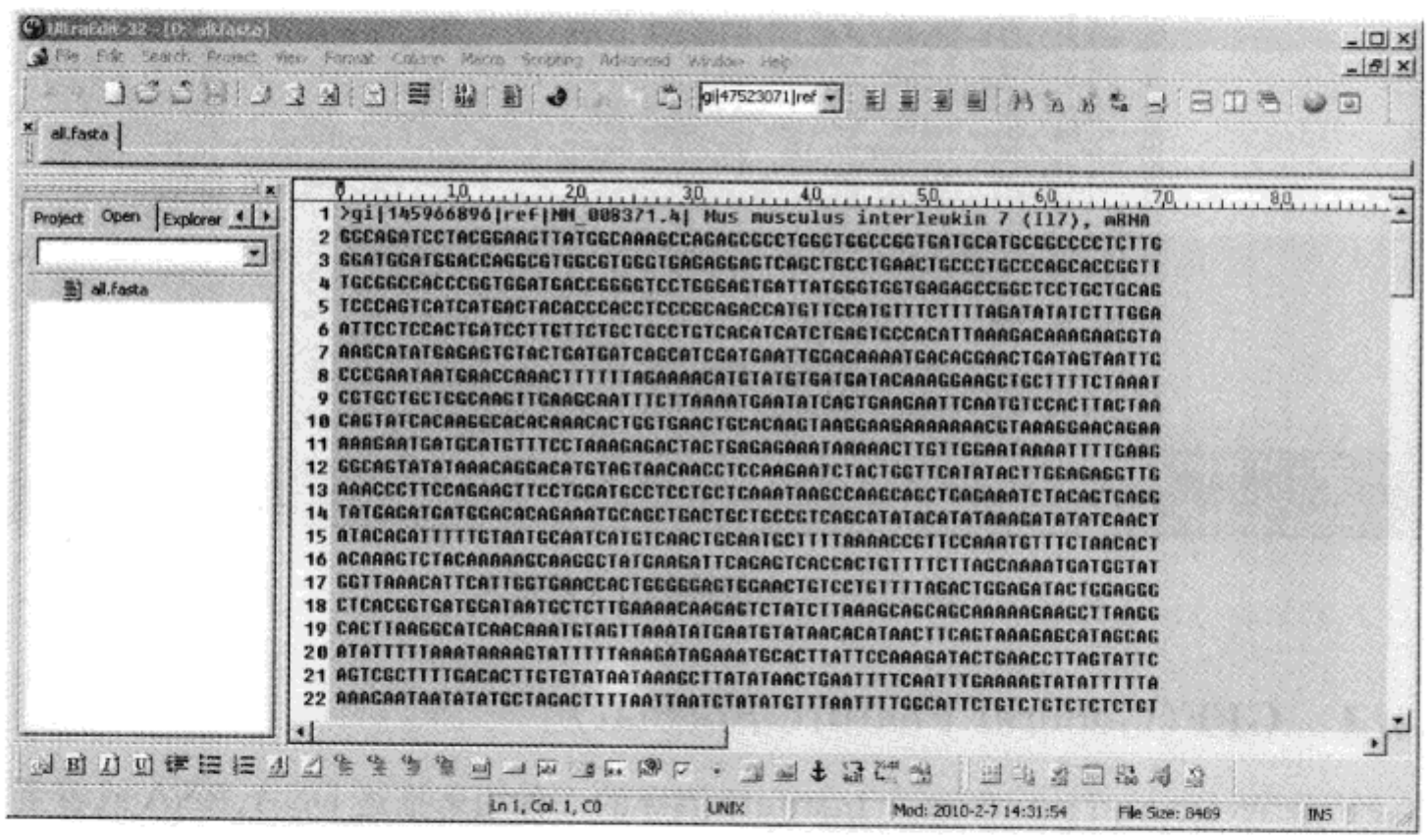


图 14-3　FASTA 格式

FASTA 格式比较自由，以“>”开头的描述单行，一般包括序列名和注释，以空白符分隔。下面紧跟表示序列的字符串，可连续多行。

虽然 FASTA 格式比较自由，但是良好的习惯有助于增加兼容性和可读性：

(1) 只使用字母、数字、下划线组成的字符串编码序列名，有可能的话，使用少于 8 个字符的字符串。

(2) 序列名后以单个 space 或者 tab 分隔序列名和注释信息，或者视需要省略注释。

(3) 紧跟描述行的是表示序列的字符串，不允许出现其他字符。

如果一个 FASTA 文件中包含多个“>”，即包含多条序列，这样的 FASTA 格式又称为 multi-FASTA，通常也简称为 FASTA。有小部分软件不能读取这样的格式。在本章中，除非上下文中特别强调了 multi-FASTA，不然 FASTA 均包含了此含义。

4　Tab(或其他分隔符)分隔的行文件

Tab(或其他分隔符)分隔的行文件格式是一类文件格式的通称，在各种软件的输入输出中有极为广泛的应用。此类格式的基本特点是一行表示一条记录，不同行表示不同的记录(图 14-4)。

Tab(或其他分隔符)分隔的行文件格式在不同应用中有不同的表现形式。

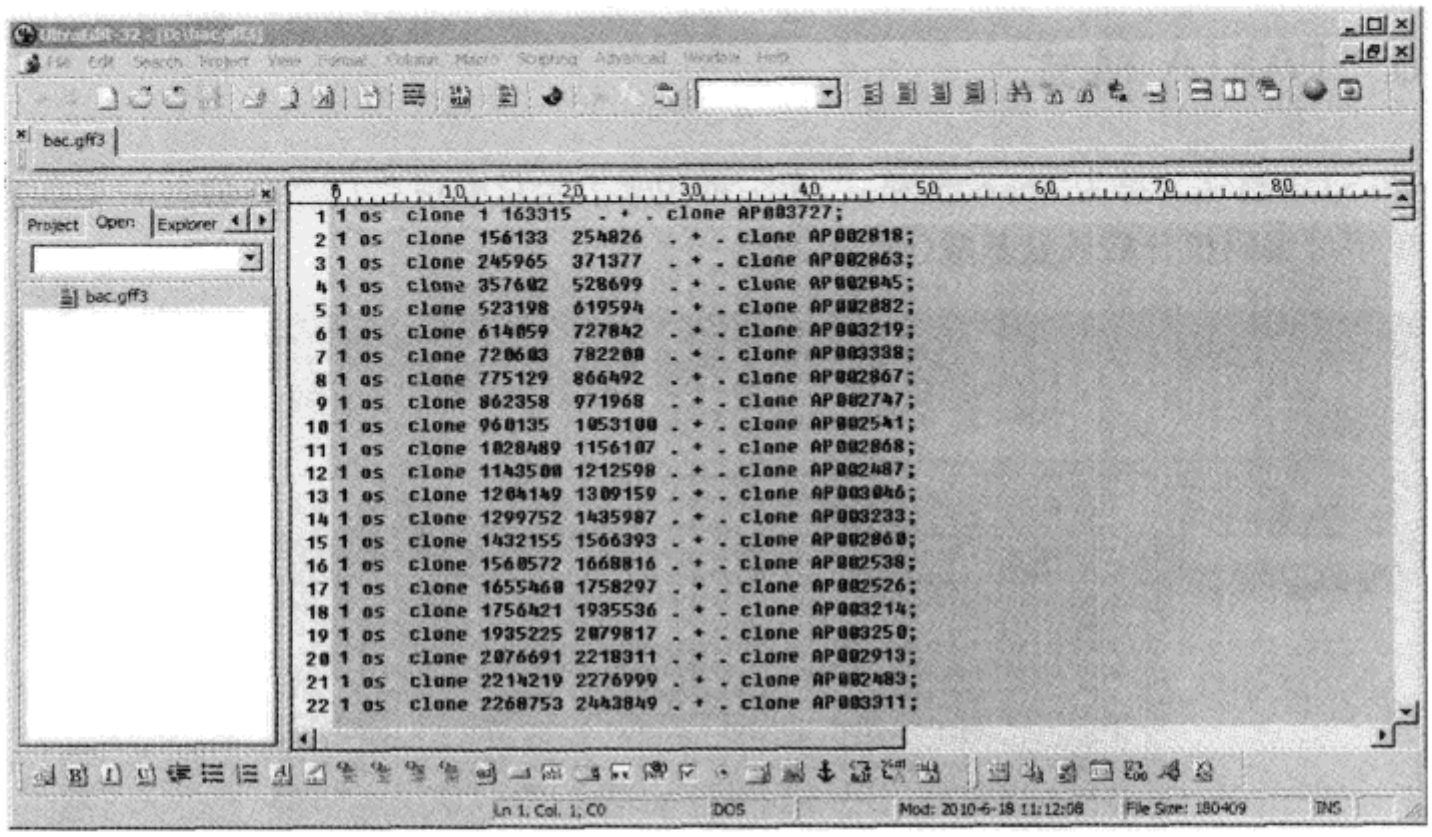


图 14-4 Tab 分隔的行文件格式

4.1 GFF(General Feature Format)

GFF 是 Welcome Trust Sanger Institute 倡导的一种用来描述 DNA、RNA 或者蛋白序列相关的基因或其他信息的交换格式(http://www.sanger.ac.uk/resources/software/gff/spec.html)。主要用于基因组相关信息的描述,GFF 文件的默认版本为第二版。每一行由<seqname> <source> <feature> <start> <end> <score> <strand> <frame> [attributes] [comments]字段组成(尖括号内容为必选项,中括号内容为可选项,下同),各字段间由 tab 分隔。

图 14-4 中显示的就是一个完整的 GFF 文件示例,表示的是水稻 BAC 的描述信息。第一列为物种编号,可以使用 NCBI Taxonomy(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy)中的编号,也可以自己任意指定,必需项。第二列表示该性状的来源,一般是物种名缩写,必需项。第三列表示该性状的类型,必需项。第四列表示起始位点,数字,起始位点必须小于终止位点,必需项。第五列表示终止位点,数字,必需项。第六列表示该性状的 score 值,浮点数,“.”表示缺失,必需项。第七列表示该性状在基因组上的方向,“+”、“-”、“.”,必需项。第八列表示 ORF 的 frame,“0”、“1”、“2”、“.”,必需项。第九列是属性项,为可选项。从第二版开始,该字段必须以“标识值”的形式表示,中间以单个空格分隔,不同的“标识值”对之间以分号分隔。标识必须使用标准标识符([A-Za-z][A-Za-z0-9]*)表示,值必须用双引号括起来。第一版的 GFF 格式中,每个字符串要小于 256 个字符,一行长度要小于 32k。对于目前的编程语言来说,这个限制似乎不再必要。第十项为注释项,为可选项,以“#”起始。

4.2 Tab 分隔的 BLAST 输出格式

BLAST 是最常用的生物信息分析软件之一。在涉及大量序列的 BLAST 分析时(如基

因组尺度的分析），为了节省时间及磁盘空间，经常会选择“output format 8”或者“output format 9”，即 tab 分隔的输出方式（图 14-5）。

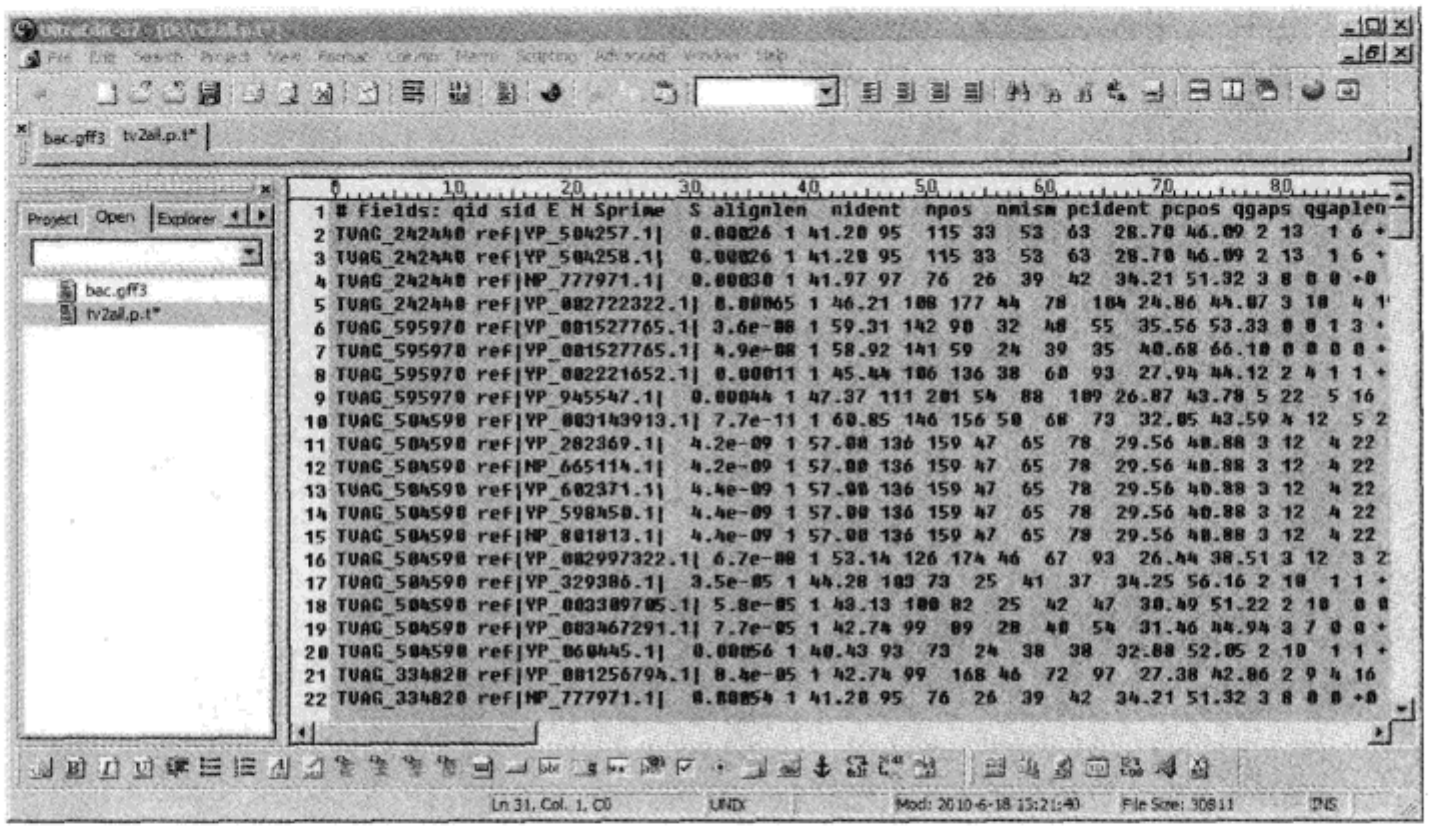


图 14-5　Tab 分隔的 BLAST 输出格式

在该输出格式中，第一列为 query id；第二列为 hit id；第三列为 E value；第七列为 alignment length；第八列为 number of identities；第十一列为 percent identity。

Tab（或其他分隔符）分隔的行文件均可以使用 Microsoft Excel 打开编辑。具体步骤为：

（1）文件→打开，“文件类型”中选择“所有文件”（图 14-6）。

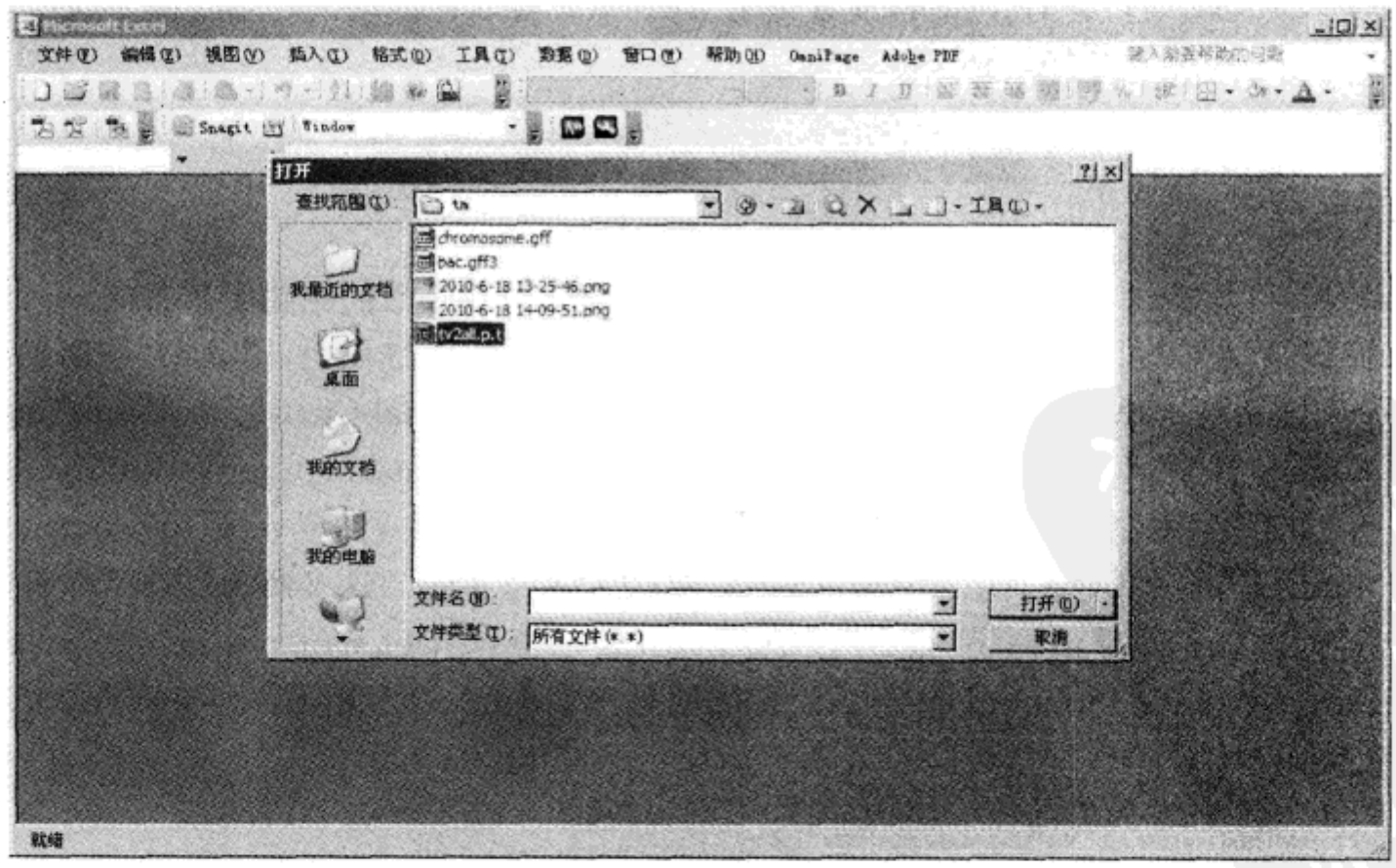


图 14-6　使用 Microsoft Excel 处理 Tab（或其他分隔符）分隔的行文件 1

(2)“分隔符号”选择 tab(或相应的分隔符)即可(图 14-7)。

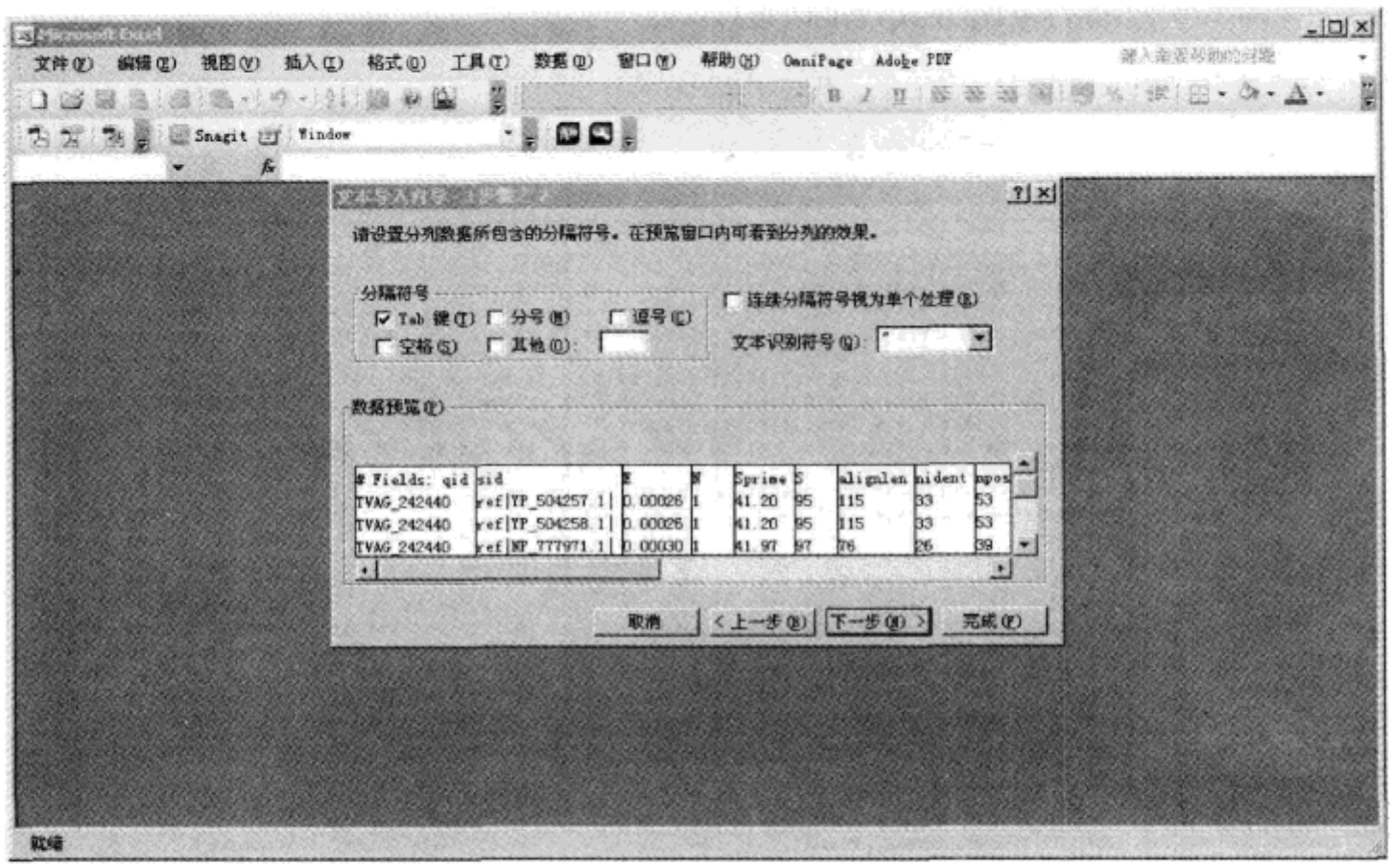


图 14-7 使用 Microsoft Excel 处理 Tab(或其他分隔符)分隔的行文件 2

需要注意的是,Microsoft Excel 有最大行数和列数限制,且数据量较大时反应比较慢。可使用 UltraEdit 或 EditPlus 等软件代替。

在某些特殊的应用场合下,需要在 Windows 操作系统下使用来自其他操作系统平台的数据(Macintosh、UNIX/LINUX),有部分软件不能正确处理其他平台的换行符。此时可使用 Microsoft Word 打开另存即可,或者使用 UltraEdit 等软件的编码转换功能解决(File→Conversions→UNIX/MAC to DOS)。

5 BLAST

BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)是应用最广泛的生物学软件之一。软件最早于 1990 由 Stephen Altschul 等开发。在二十多年的发展过程中,BLAST 主要发展出了 2 个不同系列:(1)NCBI BLAST,开源软件,由 NCBI(National Center for Biotechnology Information)开发;(2)WU-BLAST,对学术用途免费,由 Washington University 维护。2009 年初软件版权由 Advanced Biocomputing 公司(http://www.advbiocomp.com/blast.html)获得,名称也改为 AB-BLAST,仅对个人用户免费。这 2 种 BLAST 都有广泛的用户群,如 NCBI 提供的是 NCBI BLAST(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi),EBI(European Bioinformatics Institute)提供的是 WU-BLAST2(http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast/)。

NCBI BLAST 的界面如下(图 14-8):

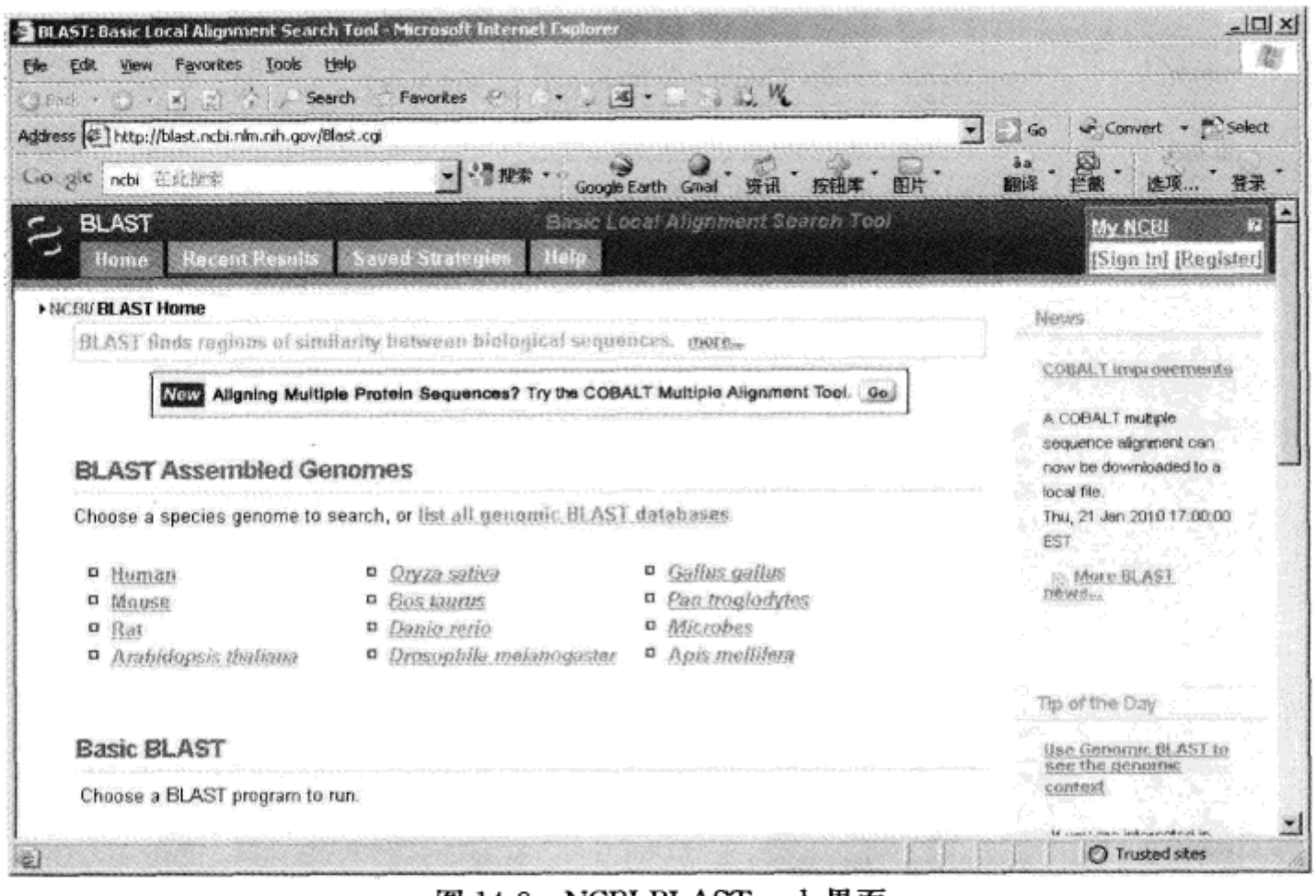


图 14-8　NCBI BLAST web 界面

具体使用步骤如下：

(1) 选择合适的 BLAST 程序：常见的 5 种 BLAST 程序及适用范围见表 14-1。

表 14-1　常见的 BLAST 程序及适用范围

程　序	查询序列	目标序列	适用类型
blastn	核酸	核酸	基因、基因组
blastp	蛋白	蛋白	基因
blastx	核酸	蛋白	基因
tblastn	蛋白	核酸	基因
tblastx	核酸	核酸	基因

查询序列一般为 FASTA 格式，可选择直接输入或上传文件的方式进行操作。

(2) 选择合适的参数(图 14-9、图 14-10、图 14-11)

如无特殊目的，一般在 database 里选择 nr(non-redundant)数据库(非默认)。

Organism 输入合适的物种名，可以选择包含或不包含。

点开 algorithm parameters。

根据经验修改合适的 expect threshold。可以使用科学计数法，如 1e-2、1e-6 等。

注意：确保 filter 中的 low complexity regions 前面为选中。

(3) 递交执行，查看结果(图 14-12)。

WU-BLAST 的搜索界面与上述类似(图 14-13)。

一般情况下，同样的参数，同样一个 hit，WU-BLAST 的结果比起 NCBI BLAST 来说，匹配的区段更长、一致性则会差一些，这样的结果可能更为生物学家所接受。

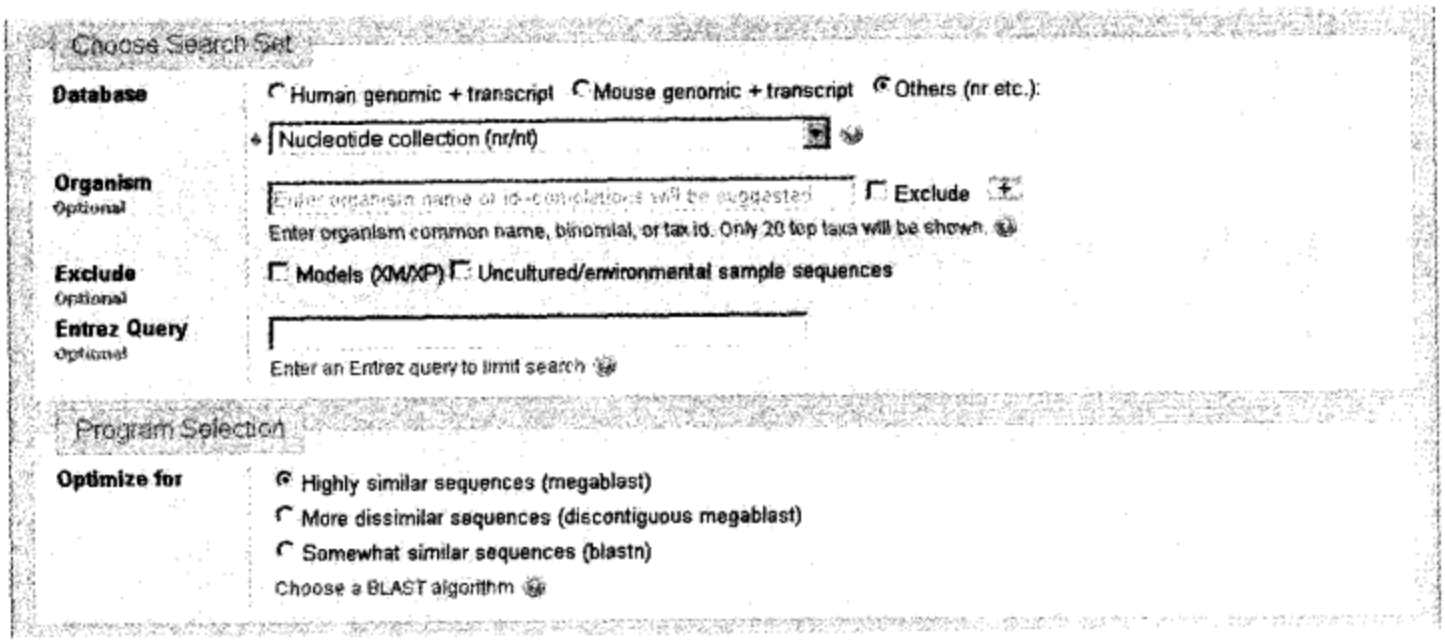


图 14-9　NCBI BLAST 参数选择 1

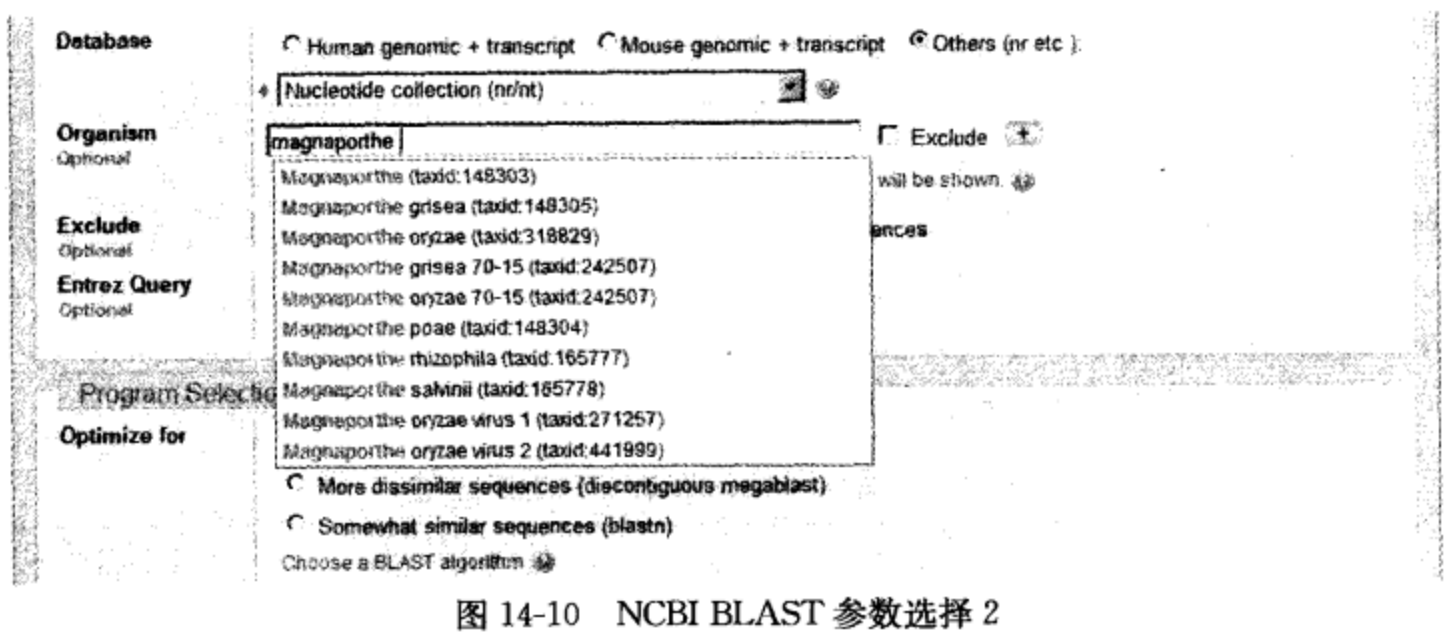


图 14-10　NCBI BLAST 参数选择 2

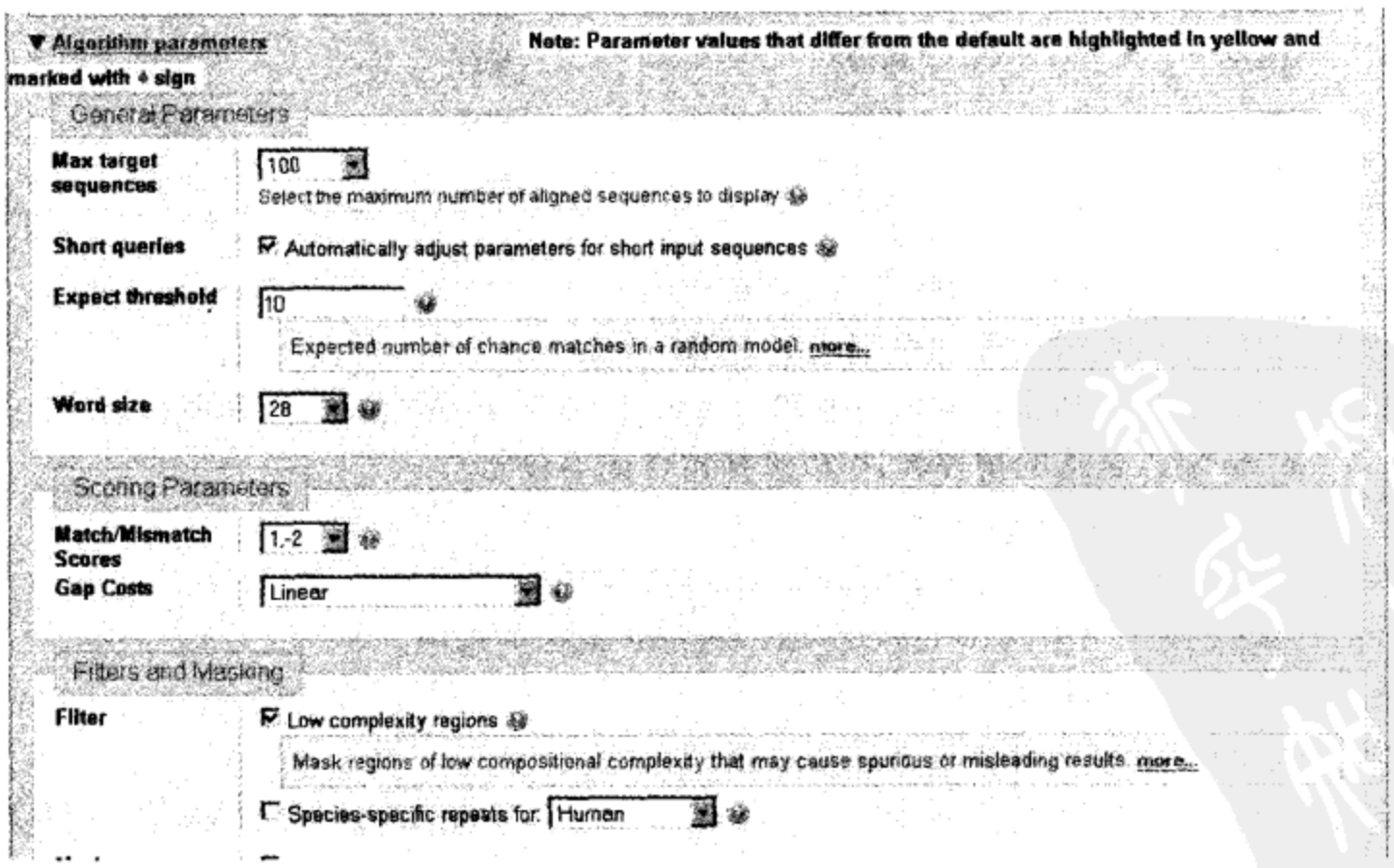


图 14-11　NCBI BLAST 参数选择 3

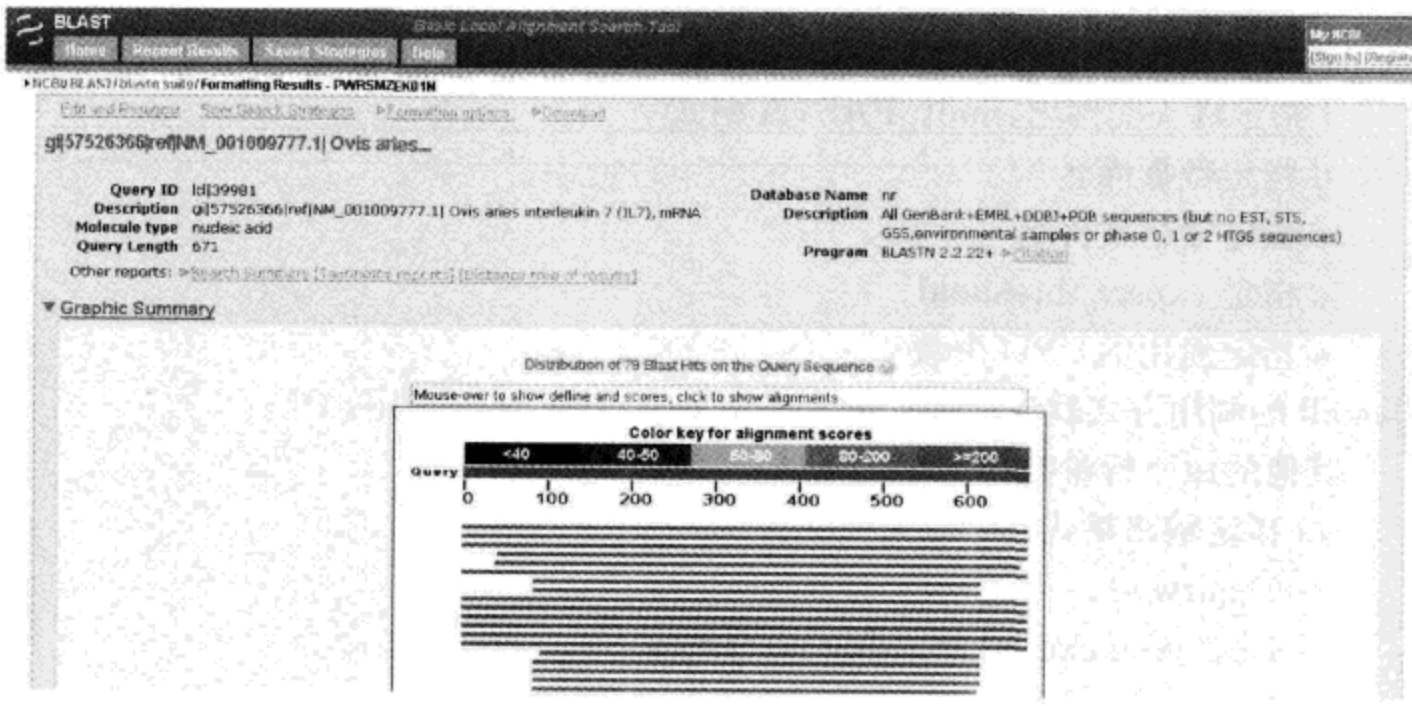


图 14-12　NCBI BLAST 结果

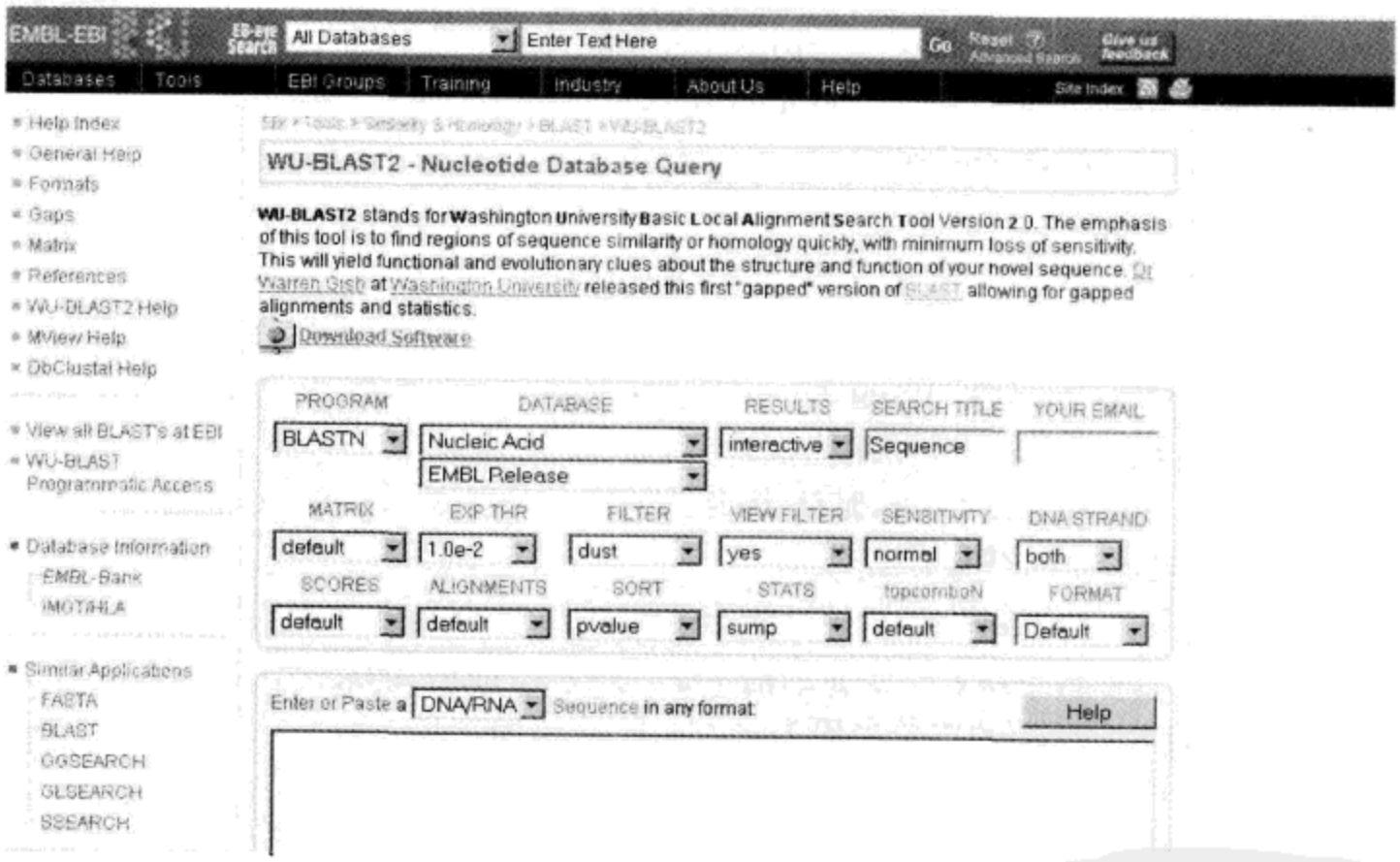


图 14-13　WU-BLAST web 界面

如需要分析的序列很多，比如做了某种真菌的 EST 测序，可以下载 NCBI BLAST 的 standalone 版本（ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/LATEST/）和合适的数据库进行本地 BLAST 搜索。如 64 位 windows 需要选择下载 blast-2.2.22-x64-win64.exe，解开压缩包，在 cmd 窗口执行如下命令即可（图 14-14）。

```
D:\blast>bin\blastall.exe -p blastn -i query -d db -o blastn.out -e 0.01 -a 8
```

图 14-14　NCBI BLAST 命令行执行

命令行参数含义：

-p 指定使用的程序

-i 指定输入文件名，multi-FASTA 格式

-d 指定数据库名

-o 指定输出文件名

-e 指定 expect threshold

-a 指定使用的 CPU 个数

blastall 的调用方式默认启用 low complexity filter，无须指定。

其他的命令行参数：

-m 指定输出格式：

0 pairwise

1 query-anchored showing identities

2 query-anchored no identities

3 flat query-anchored, show identities

4 flat query-anchored, no identities

5 query-anchored no identities and blunt ends

6 flat query-anchored, no identities and blunt ends

7 XML Blast output

8 tabular

9 tabular with comment lines

10 ASN, text

11 ASN, binary [Integer]

默认输出格式为 0，常用格式为 7、9

-F 使用 low complexity filter，默认为 T

-I 显示 GI，默认为 F，建议改成 T

-v 显示单行描述的序列数。如显示前十条，改成 10 即可，以此类推

-b 显示联配结果的序列数。如显示前十条，改成 10 即可，以此类推

-Q 指定查询序列使用的遗传密码表

-D 指定数据库序列使用的遗传密码表

-O 输出联配结果

-M 指定使用的打分矩阵，默认为 BLOSUM62

-n 使用 MegaBlast 算法，默认为 F。在 EST 数据分析里可以选择打开，可较大的提高搜索速度

-q 一个碱基错配的罚分值

-r 一个碱基配对的加分值

其中-q/-r/-M 3 个参数对联配结果的影响较大，在不确定的情况下，建议使用缺省值。

6 Primer Premier 5

Primer Premier 是一款由 Premier Biosoft（http://www.premierbiosoft.com/primer-

design/)开发的专门用于各种 PCR 引物设计,评估的商业软件。软件也支持基于序列联配结果的简并引物(degenerate primer)的设计(图 14-15)。

作为一款商业软件,Primer Premier 内置了一些对于日常实验室工作较为实用的功能。如核酸序列的 motif 分析、ORF 以及限制酶位点的查找,蛋白→核酸以及核酸→蛋白序列的相互转换。

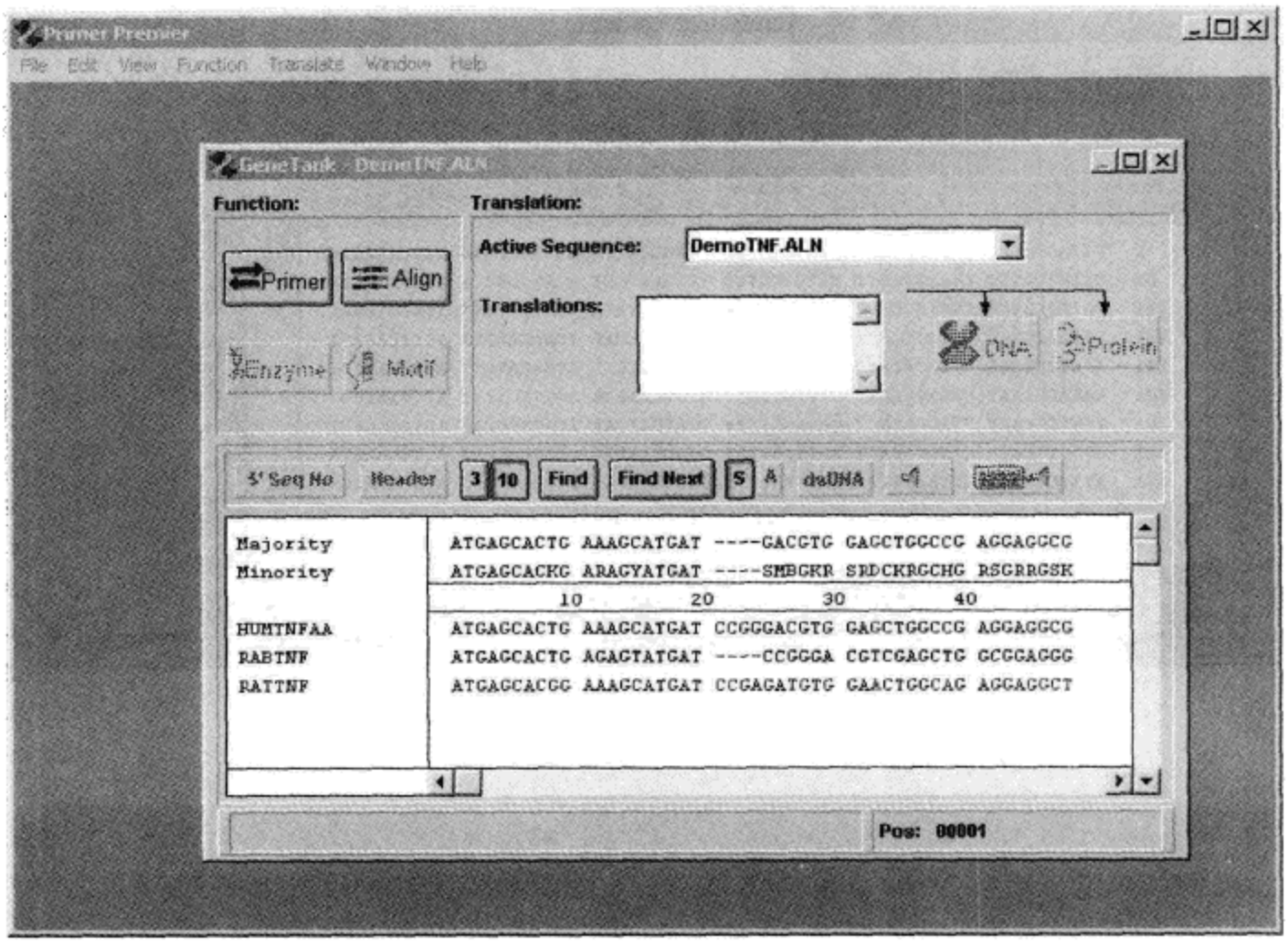


图 14-15　Primer Premier 界面

Primer Premier 的引物设计过程比较直观,简单易用。

(1) 导入序列:File→Open→DNA sequence。软件不支持直接打开 multi-FASTA 格式文件,只能通过打开单序列 FASTA 文件,然后 File→Insert Sequence 的方式处理多条序列(设计简并引物)。

(2) 序列编辑:打开序列后出现 GeneTank 序列编辑界面(图 14-16)。

点击窗口中的 Enzyme 可以进行酶切位点分析(图 14-17)。

点击窗口中的 Motif 可以搜索 motif(图 14-18)。使用 Add/Del 增删需要搜索的 motif。

需要注意的是,由于软件发布于 2000 年,因此自带的 motif 库比较陈旧,此时可以使用 Edit 增加新的 motif 定义(图 14-19)。

(3) 引物设计:引物设计是软件的主要功能,因此设置选项比较丰富(图 14-20)。

设置引物类别、5′和 3′引物的位置、预期 PCR 产物长度等参数。执行后 Search Progress 对话框右下角显示设计成功的引物对数(图 14-21)。

选中 Search Results 里的一对引物会以图形化的方式显示该引物对的各种特性(hairpin、dimer、false priming、cross dimer)(图 14-22)。

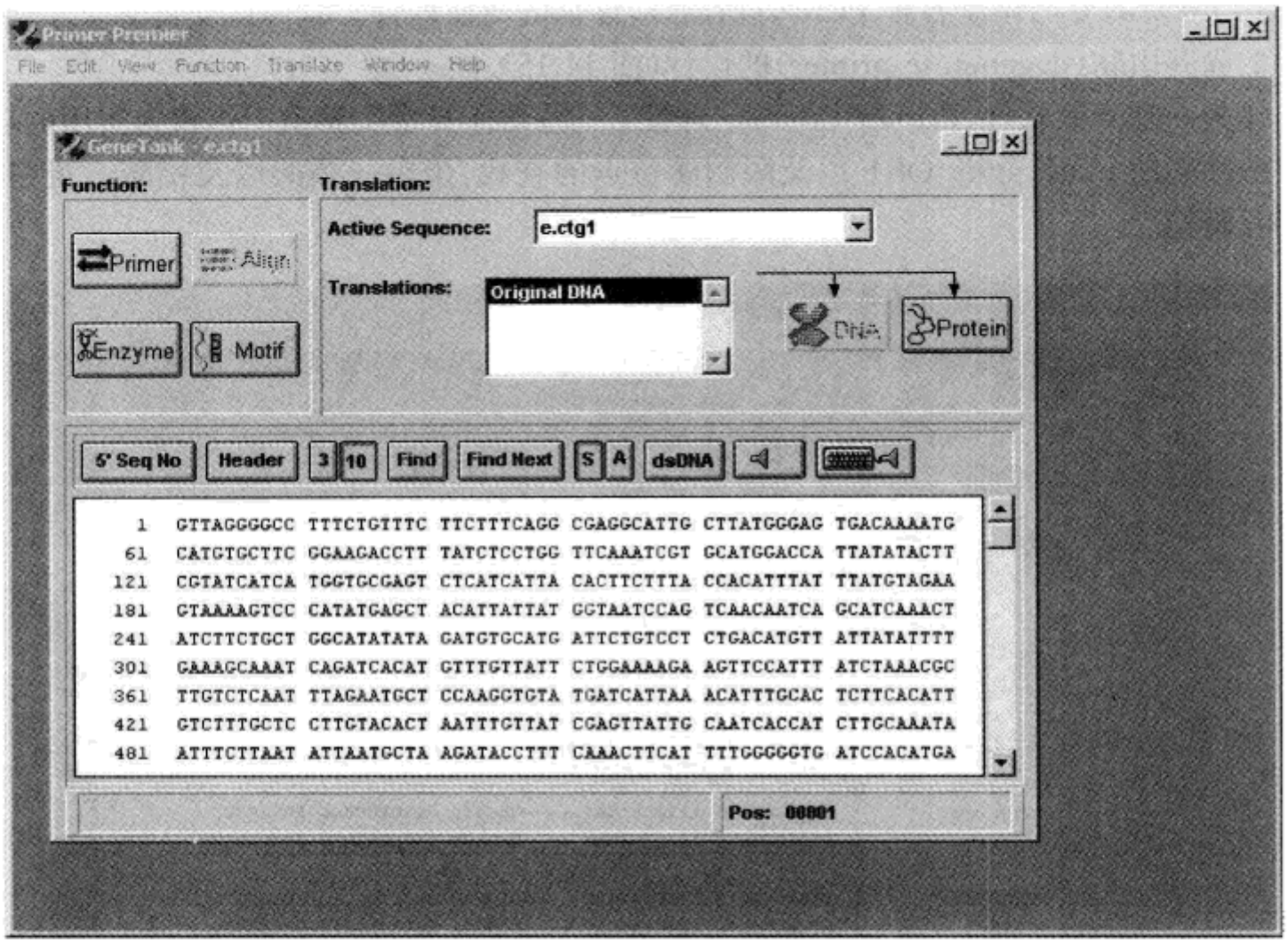


图 14-16 GeneTank 序列编辑界面 1

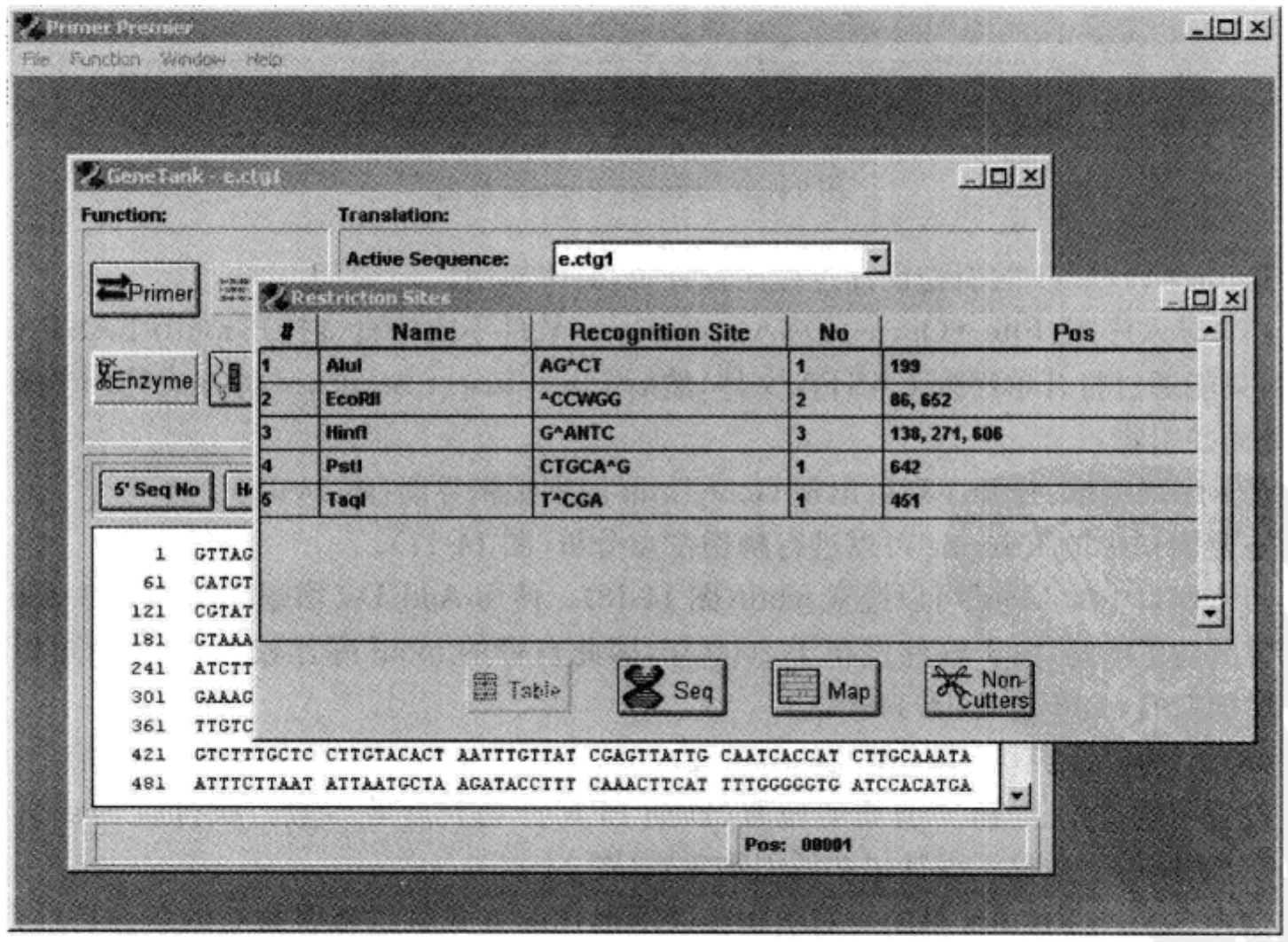


图 14-17 酶切位点分析

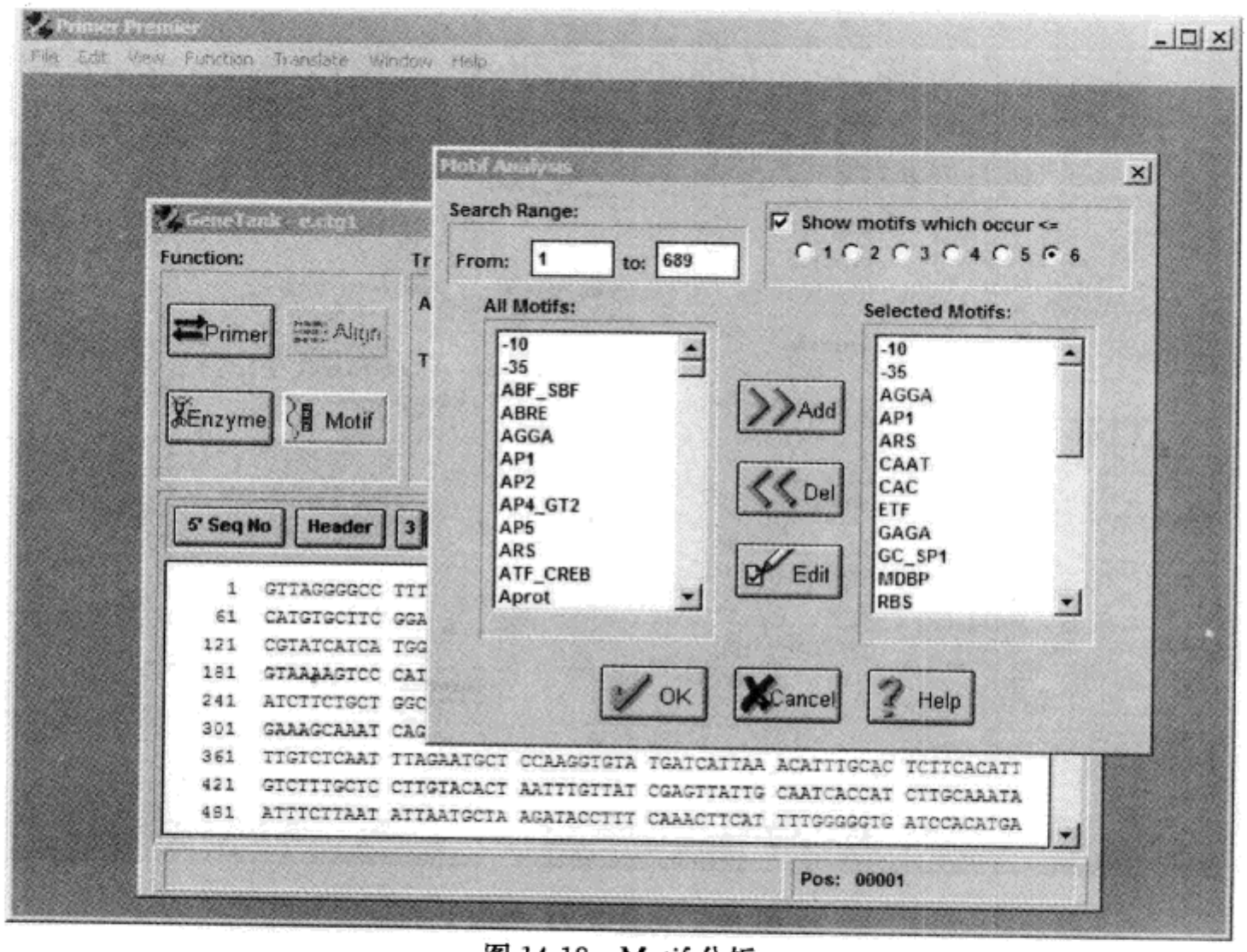


图 14-18　Motif 分析

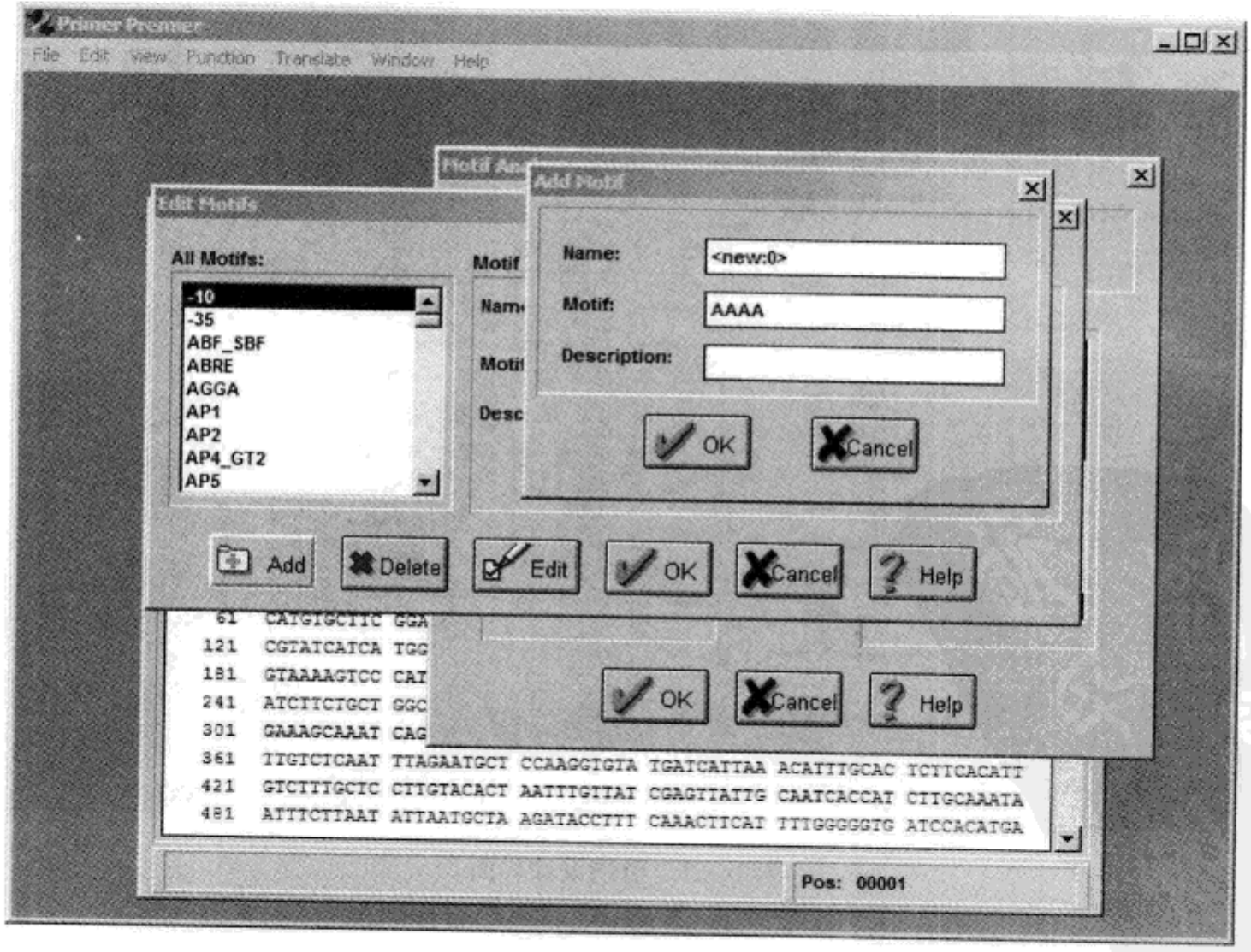


图 14-19　增加新的 motif 定义

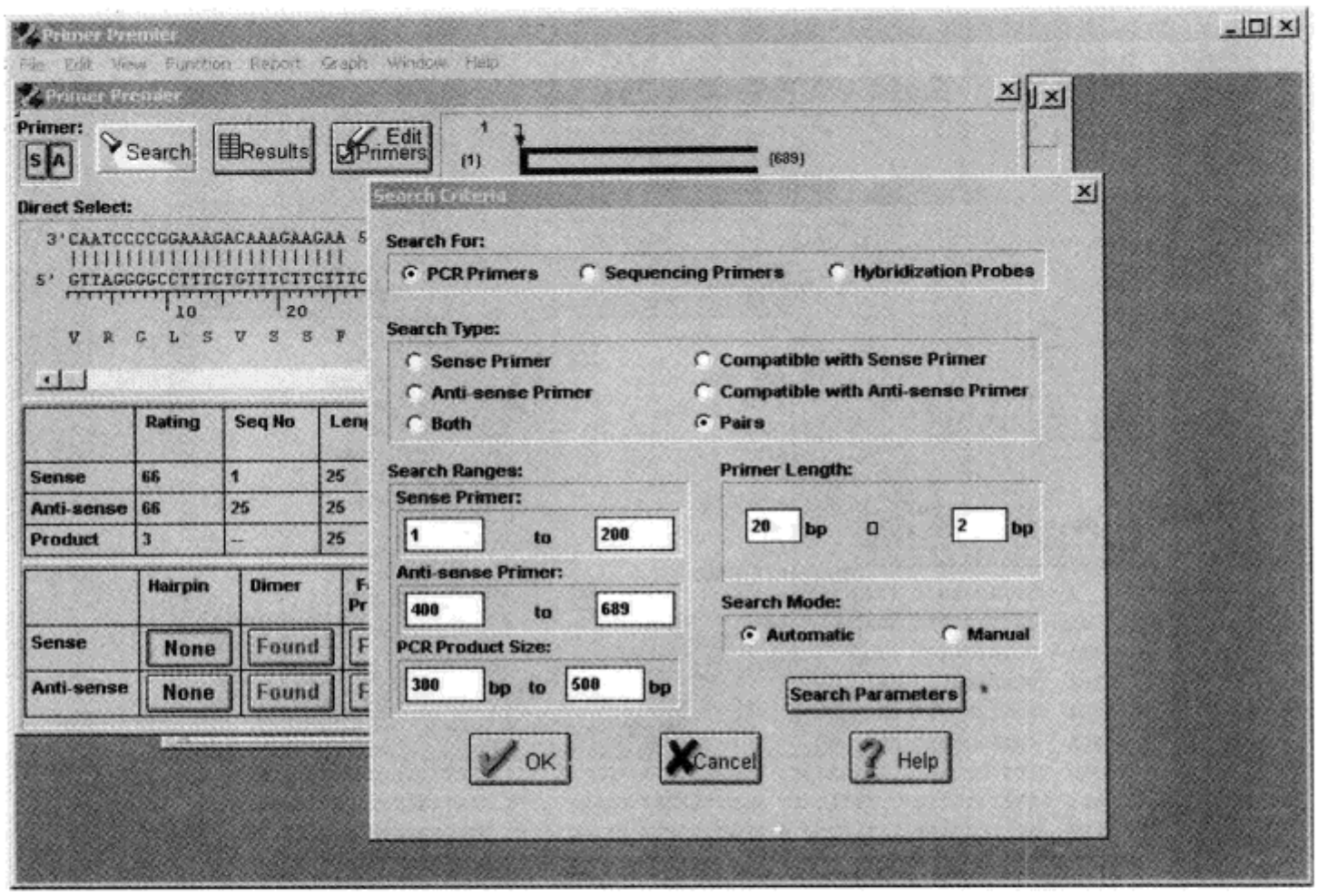


图 14-20 引物设计界面 1

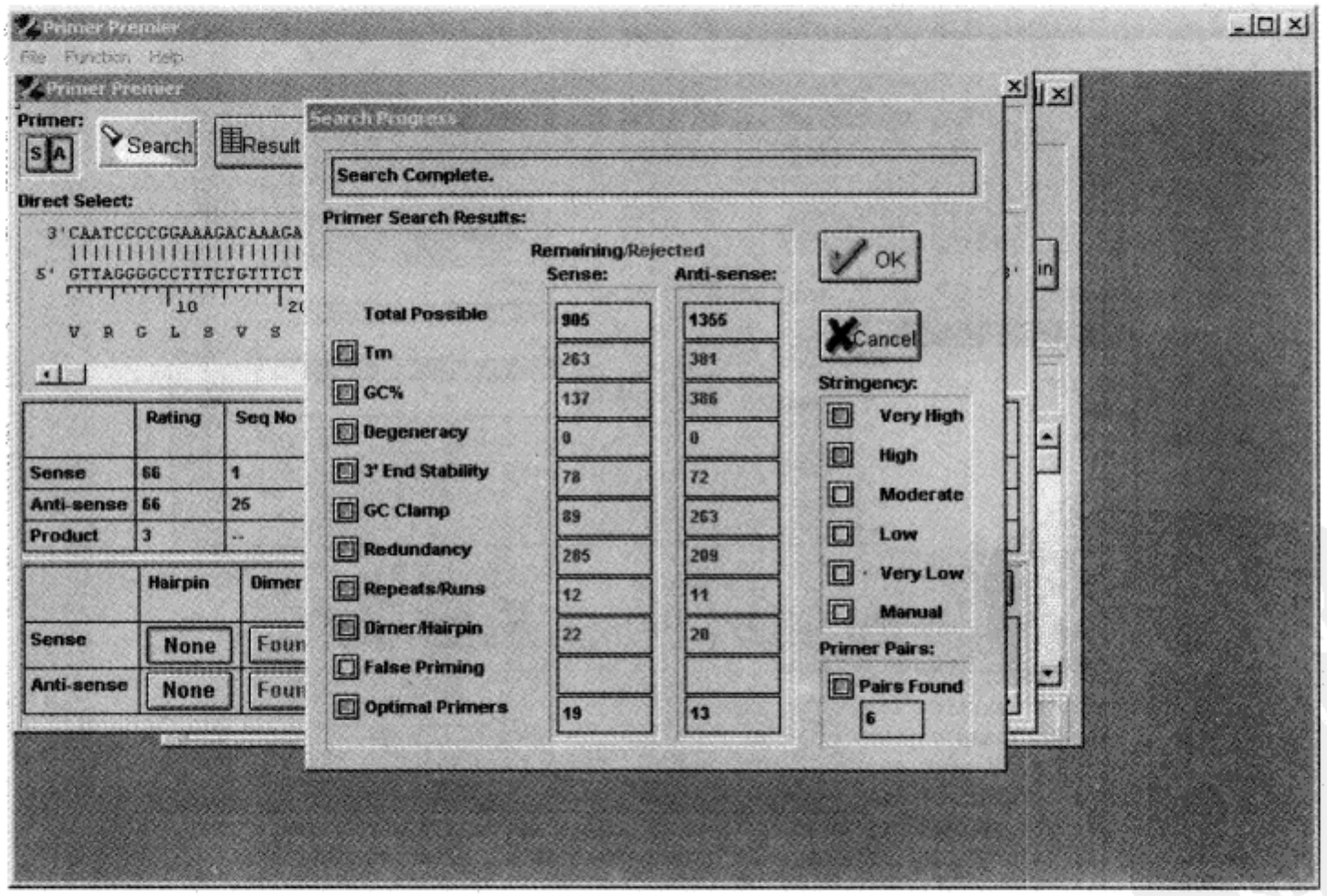
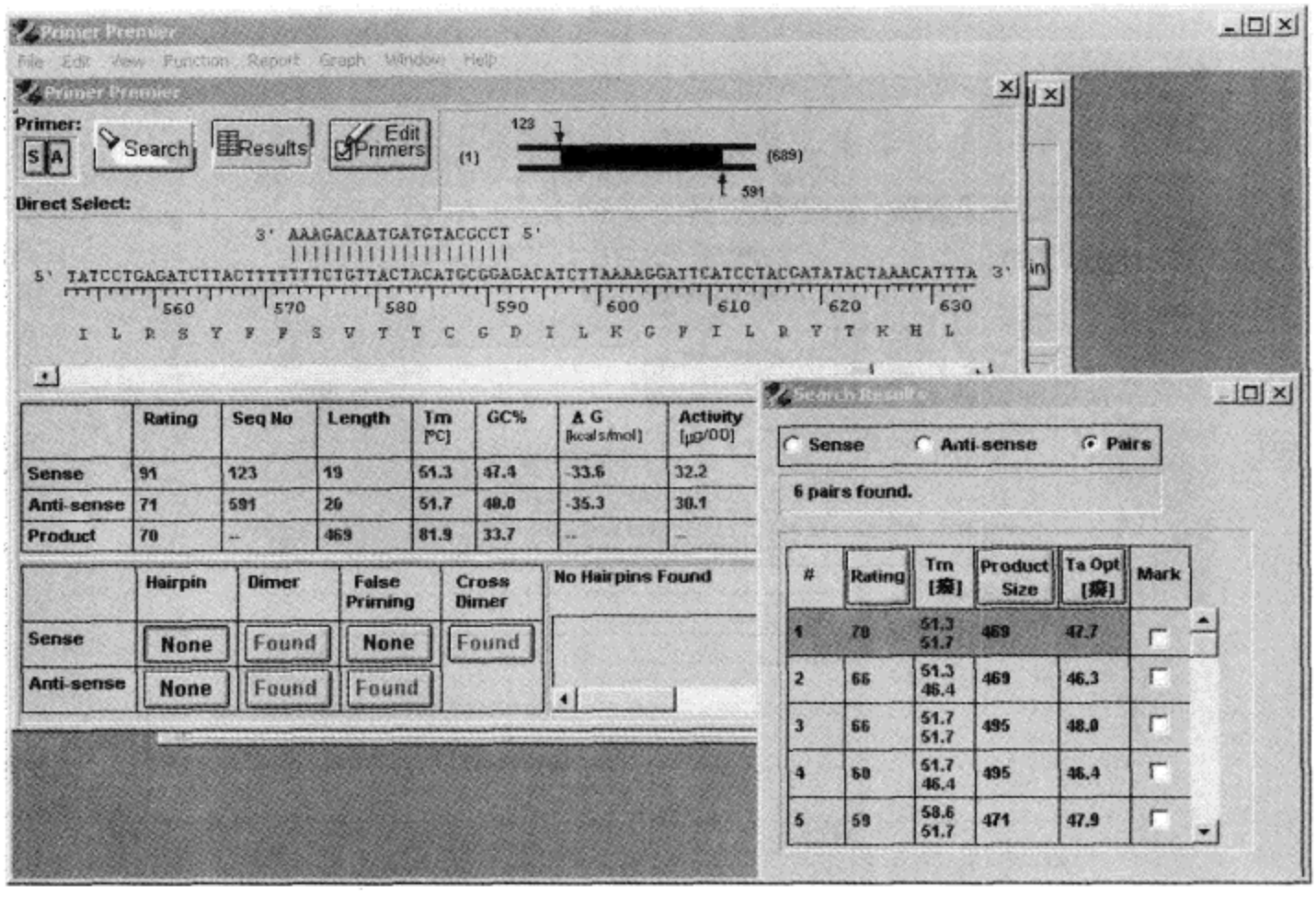


图 14-21 引物设计界面 2



	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	Δ G [kcal/mol]	Activity [μg/00]
Sense	91	123	19	51.3	47.4	-33.6	32.2
Anti-sense	71	591	20	51.7	40.0	-35.3	30.1
Product	70	--	469	81.9	33.7	--	--

	Hairpin	Dimer	False Priming	Cross Dimer
Sense	None	Found	None	Found
Anti-sense	None	Found	Found	

#	Rating	Tm [癌]	Product Size	Ta Opt [癌]	Mark
1	70	51.3 51.7	469	47.7	
2	66	51.3 46.4	469	46.3	
3	66	51.7 51.7	495	48.0	
4	60	51.7 46.4	495	46.4	
5	59	58.6 51.7	471	47.9	

图 14-22　引物设计界面 3

File→Print，保存结果。

根据多序列联配结果进行引物设计可能在研究未测序物种的基因时需要用到。其设计的一般步骤为：

(1) 对已测序模式生物的同源基因进行多序列联配(使用 Clustal 等，也可使用软件自带的 Align 功能)。

(2) File→Open→Alignment，注意序列名不能包含特殊符号，如 NCBI 下载序列中的“|”，EMBL 下载序列中的“:”等(图 14-23)。

(3) 参照普通引物设计。

7　e-PCR

e-PCR(Electronic PCR)是一款 NCBI 开发的用于在 DNA 序列上定位 STSs(sequence tagged sites)的工具(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/)。它提供了 Forward e-PCR 和 Reverse e-PCR 2 种功能，分别用于在 STS 数据库和序列数据库中执行搜索。此程序提供了验证 Primer Premier、Oligo 和 Primer3 等引物设计软件所设计引物有效性的有效手段(图 14-24)。

本程序提供源代码(ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/schuler/e-PCR/)，最新版本为 2.3.12，一般需编译后在本地运行。

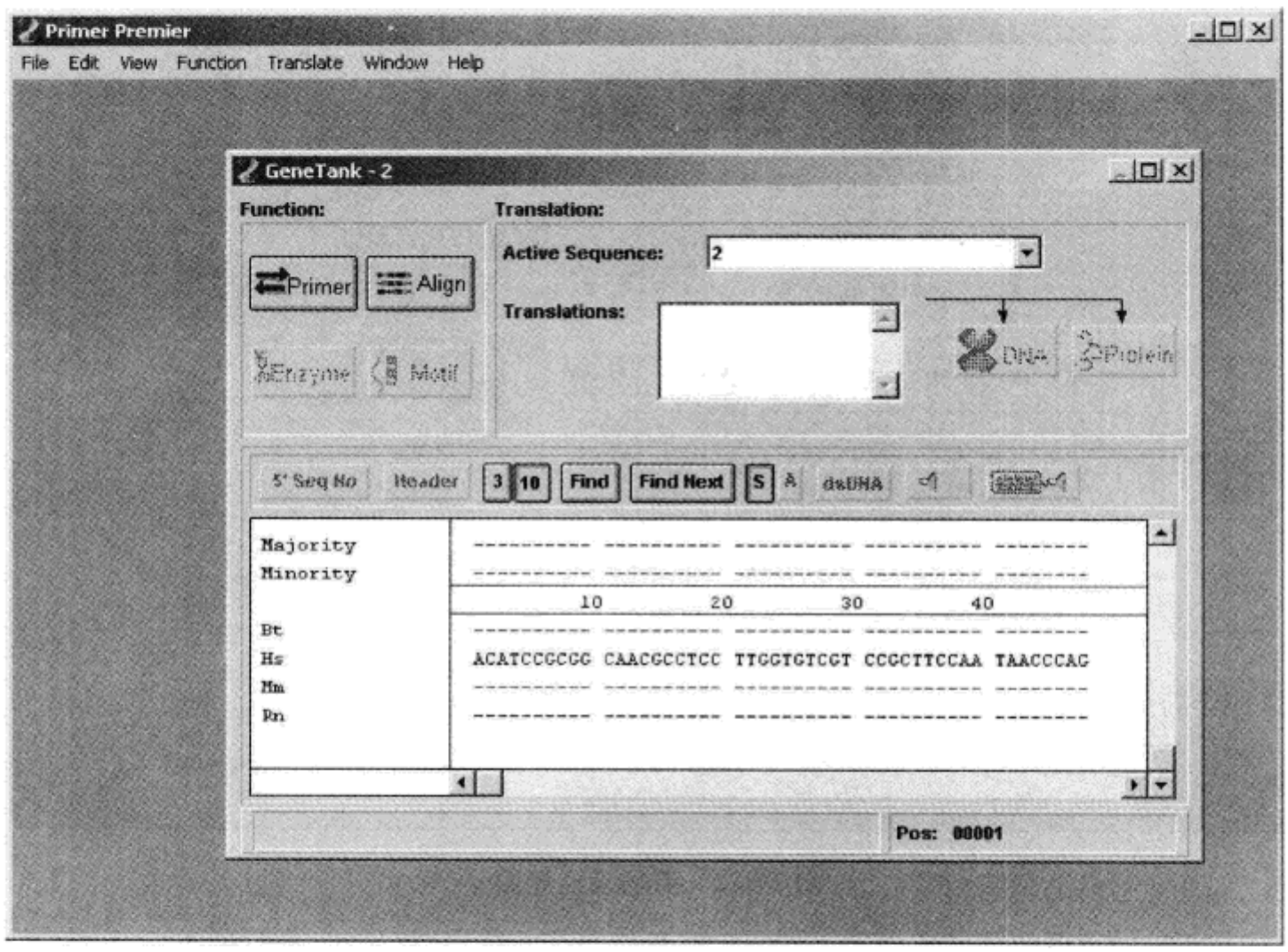


图 14-23 GeneTank 序列编辑界面 2

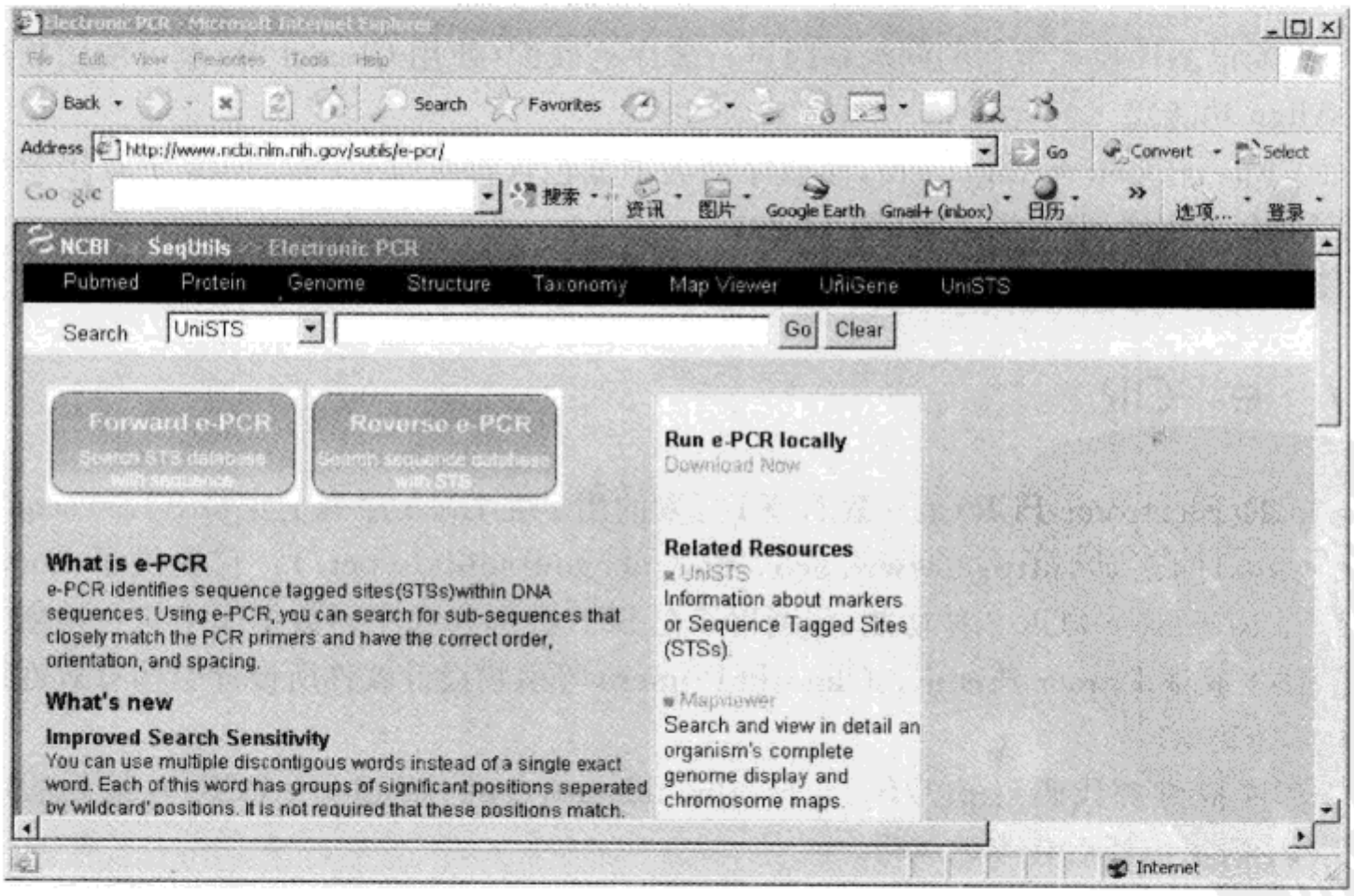


图 14-24 NCBI e-PCR

直接用 Microsoft Visual Studio 2005 系列版本在 Windows 下编译此程序需遵循如下步骤：

解开压缩包；

修改全部源码里的自定义头文件的引用方式使之符合 VC 的规范；

调用 VS2005 的命令行，运行 nmake all -f stand/Makefile. vc8。

编译后的 e-PCR 提供 4 个可运行组件：famap、fahash、e-PCR、re-PCR。

用 e-PCR 验证引物有效性的步骤如下

(1) 准备用于 re-PCR 搜索的序列数据库

1) Workroot＞ *famap -tN -b a1. famap a1*

Workroot＞ 当前工作目录，"＞"后为用户输入的内容，斜体表示，下同

参数说明：

-t 使用内置转换功能转换碱基符号

N 使用[AGCTN]，[acgtn]全部转换成大写，其他字母转换成 N，忽略所有其他符号

NX 使用 iupac_na 中定义的符号，小写转换成大写，忽略所有其他符号

-b 建立 famap 文件，文件名为 a1. famap(包含路径，此处为当前目录，可省略，下同。文件名必须以 . famap 结尾)

a1 输入文件，文件名为 a1，multi-FASTA 格式

2) Workroot＞ *fahash -b a1. hash -w* 12 *-f*3 *a1. famap*

参数说明：

-b 建立 hash 文件，文件名为 a1. hash(文件名必须以 . hash 结尾)

-w 作为索引的核苷酸串长度

-f 作为索引的非连续核苷酸串长度，1 表示连续

a1. famap 输入文件名，为上一步产生的 famap 文件

(2) 执行 re-PCR(图 14-25)

Workroot＞ *re-PCR -S a1. hash -o epcr_out epcr_in*

参数说明：

-S 在 a1. hash 文件中执行 STS 查找，STSs 从文件读入。若使用-s，则直接在命令行中给出引物对

-o 输出选项，将结果保存在 epcr_out 文件中

epcr_in 输入文件名，为 tab 分隔的行文件(图 14-25)。

每一行为一条引物记录，分成五列，依次为引物编号(必需)、5′引物(必需)、3′引物(必需)、预计产物长度(可选，具体数字表示精确长度，"-"分隔表示范围)、附加信息(可选，此处为引物

```
AGN_0F3809k17.g1_1-633_0  TGGCTTGCTTAGACGCAAAT  TTTGATTCGACATTAGTGGTGC  250-500 448
AGN_0F3809k17.g1_1-633_1  TAGGGGGAAGCAATTAGTGG  TTTGATTCGACATTAGTGGTGC  250-500 465
AGN_0F3809k17.g1_1-633_2  CTAGGGGGAAGCAATTAGTGG TTTGATTCGACATTAGTGGTGC  250-500 466
AGN_0F3809k17.g1_1-633_3  TTACGTTGTGAGAAGGGCTG  TTTGATTCGACATTAGTGGTGC  250-500 490
AGN_0F3809k17.g1_1-633_4  GCTAGGGGGAAGCAATTAGTG TTTGATTCGACATTAGTGGTGC  250-500 467
AGN_0F3809k13.b1_425-839_0  AAGTACAAATGCAGGGTCGC  TCATCGAATGAAAGTGCTCG  250-500 311
AGN_0F3809k13.b1_425-839_1  GGCAAAGTACAAATGCAGGG  TCATCGAATGAAAGTGCTCG  250-500 315
AGN_0F3809k13.b1_425-839_2  TCCGTCACTTGTTCTAAGCG  TCATCGAATGAAAGTGCTCG  250-500 337
AGN_0F3809k13.b1_425-839_3  CGTCACTTGTTCTAAGCGCC  TCATCGAATGAAAGTGCTCG  250-500 335
AGN_0F3809k13.b1_425-839_4  GTCACTTGTTCTAAGCGCCG  TCATCGAATGAAAGTGCTCG  250-500 334
```

图 14-25　re-PCR 输入文件格式

设计时软件给出的产物长度)。此文件可以用 Microsoft Excel 建立,保存成纯文本即可。

(3) 结果文件解析:epcr_out 结果文件名,为 tab 分隔的行文件(图 14-26)。

```
#- sts  seq strand  from  to  mism  gaps  act_len/exp_len
AGN_OF3809k13.b1_425-839_0  AGN_ELP025b24.b1  + 104 443 0 0 340/250-500
AGN_OF3809k13.b1_425-839_1  AGN_ELP025b24.b1  + 100 443 0 0 344/250-500
AGN_OF3809k13.b1_425-839_2  AGN_ELP025b24.b1  + 78  443 0 0 366/250-500
AGN_OF3809k13.b1_425-839_3  AGN_ELP025b24.b1  + 80  443 0 0 364/250-500
AGN_OF3809k13.b1_425-839_4  AGN_ELP025b24.b1  + 81  443 0 0 363/250-500
AGN_OF3787m07.g1_1-359_0  AGN_OF3454p23.g1  + 25  346 0 0 322/250-500
AGN_OF3787m07.g1_1-359_1  AGN_OF3454p23.g1  + 25  345 0 0 321/250-500
AGN_OF3787m07.g1_1-359_2  AGN_OF3454p23.g1  + 26  346 0 0 321/250-500
AGN_OF3787m07.g1_1-359_3  AGN_OF3454p23.g1  + 26  346 0 0 321/250-500
```

图 14-26 re-PCR 输出文件格式

每一行为一条输出记录("#"开头的为注释行),分成八列,依次为引物编号、e-PCR 序列编号、匹配方向、hit 起始位点、hit 终止位点、错配数、gap 数、产物长度/预期范围。此文件可以用 Microsoft Excel 打开。

理想情况下,第一列第二个"_"前的部分应该和第二列相同,第八列产物长度应该和设计软件给出的产物长度相近,即表示该引物可以扩增出预期的片段(图 14-27,图 14-26)结果表示这些引物均不太可能扩增出预期片段。

```
rcfaCtg33078.a1_392-910_1 rcfaCtg33078.a1 + 503 814 0 0 312/250-500
rcfaCtg33078.a1_392-910_4 rcfaCtg33078.a1 + 396 814 0 0 419/250-500
rcfaCtg33078.a1_392-910_3 rcfaCtg33078.a1 + 501 820 0 0 320/250-500
rcfaCtg33078.a1_392-910_0 rcfaCtg33078.a1 + 503 820 0 0 318/250-500
rcfaCtg33093.a1_230-780_0 rcfaCtg33093.a1 + 335 777 0 0 443/250-500
rcfaCtg33093.a1_230-780_2 rcfaCtg33093.a1 + 339 777 0 0 439/250-500
rcfaCtg33093.a1_230-780_3 rcfaCtg33093.a1 + 333 777 0 0 445/250-500
rcfaCtg33093.a1_230-780_1 rcfaCtg33093.a1 + 335 776 0 0 442/250-500
rcfaCtg33093.a1_230-780_4 rcfaCtg33093.a1 + 335 773 0 0 439/250-500
rcfaCtg34016.a1_1585-2109_4 rcfaCtg34016.a1 + 1613  2034  0 0 422/250-500
```

图 14-27 通过 re-PCR 测试的引物

此外,e-PCR 还有一个功能是使用序列在 STS 数据库里查找合适的标记,此功能与上面执行的过程刚好相反。

Workroot> *e-PCR -w9 -f 1 -m100 stsdb -d 250-500 a1 -n1 -g1 -t3*

stsdb STS 数据库文件,与 re-PCR 的输入文件格式完全相同,为 tab 分隔的行文件

a1 用于查找的 FASTA 文件

-w 建立引物索引的字符串长度

-f 建立引物索引时允许的非连续字符串长度,1 表示连续

-m 允许的实际产物长度与预期产物长度的最大偏差

-d 如果 stsdb 中没有给定产物长度,则设置默认产物长度

-n 每个引物允许的最大 mismatch 数

-g 每个引物允许的最大的 gap 长度

-t 输出格式,3 表示 tab 分割的行文件,分成九列。依次为序列编号、STS 编号、hit 方向(+/-)、hit 起始位点(不包括 floppy tail)、hit 终止位点(不包括 floppy tail)、实际产物

长度/预期产物长度、引物对 mismatch 数、引物对的 gap 数、STS 的描述。若选择输出格式4，则除以上项目外，还包括引物对与序列的联配情况（以“#”开头的注释行）

8 Clustal

Clustal（http://www.clustal.org/）是一款免费的获得广泛应用的多序列联配软件。由 Des Higgins、Julie Thompson 和 Toby Gibson 共同开发。由于其优异的表现，相当多的商业软件和网站整合了该软件的各种版本，如 Primer Premier 5、EBI（http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html）、Swiss Institute of Bioinformatics（http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html）。

由于应用场合的差异，Clustal 提供 2 个可运行版本：命令行版本 ClustalW 和图形化版本 ClustalX（图 14-28）。目前的最新版本为 2.0.12。

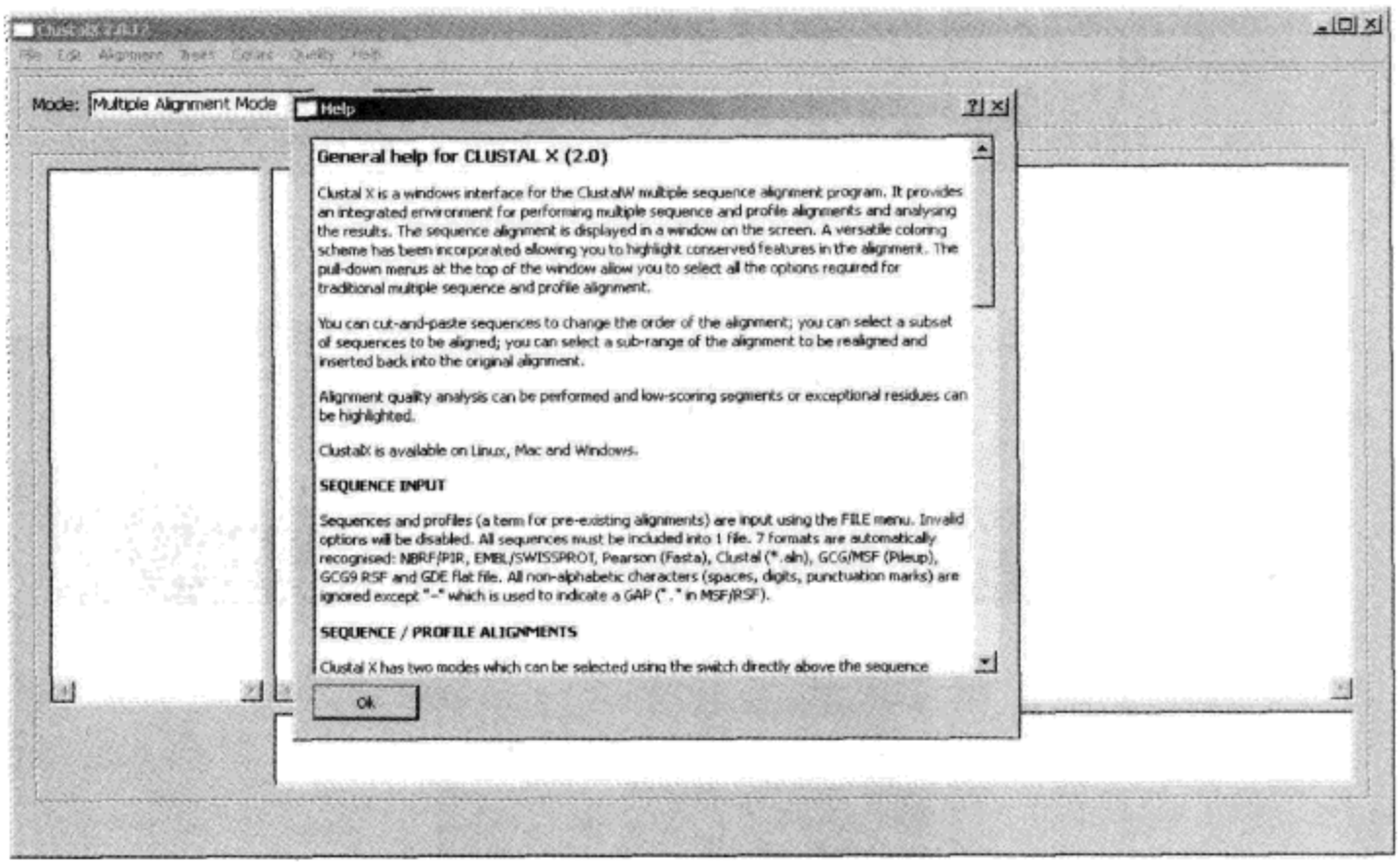


图 14-28　ClustalX 界面

下面以 ClustalX 为例说明其用法。

（1）导入序列（图 14-29）：File→Load Sequences。目前，Clustal 支持 7 种输入格式：NBRF/PIR、EMBL/SWISSPROT、Pearson（FASTA）、Clustal（*.aln）、GCG/MSF（Pileup）、GCG9 RSF 和 GDE。

（2）多序列联配（图 14-30）：设置多序列联配参数。Alignment→Alignment Parameters→Multiple Alignment Parameters。根据需要选择不同的 Weight Matrix。

Alignment→Do Complete Alignment。一个完整的多序列联配过程包括 3 个步骤：

1）所有序列进行两两的 pairwise alignment；

2）构建 dendrogram，根据序列相似性描述大致的分组；

3）使用 dendrogram 进行多序列联配。

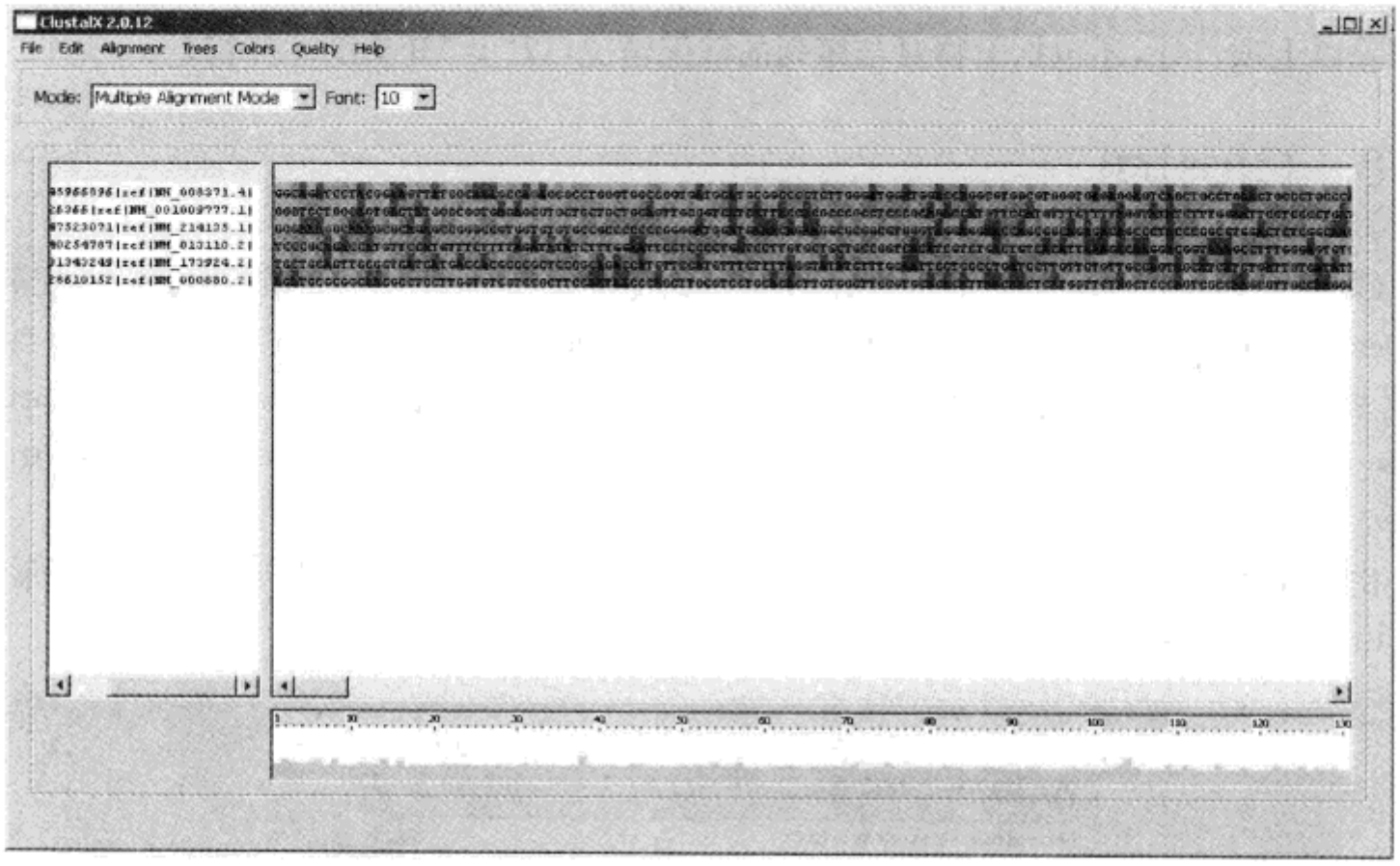


图 14-29　ClustalX 使用界面 1

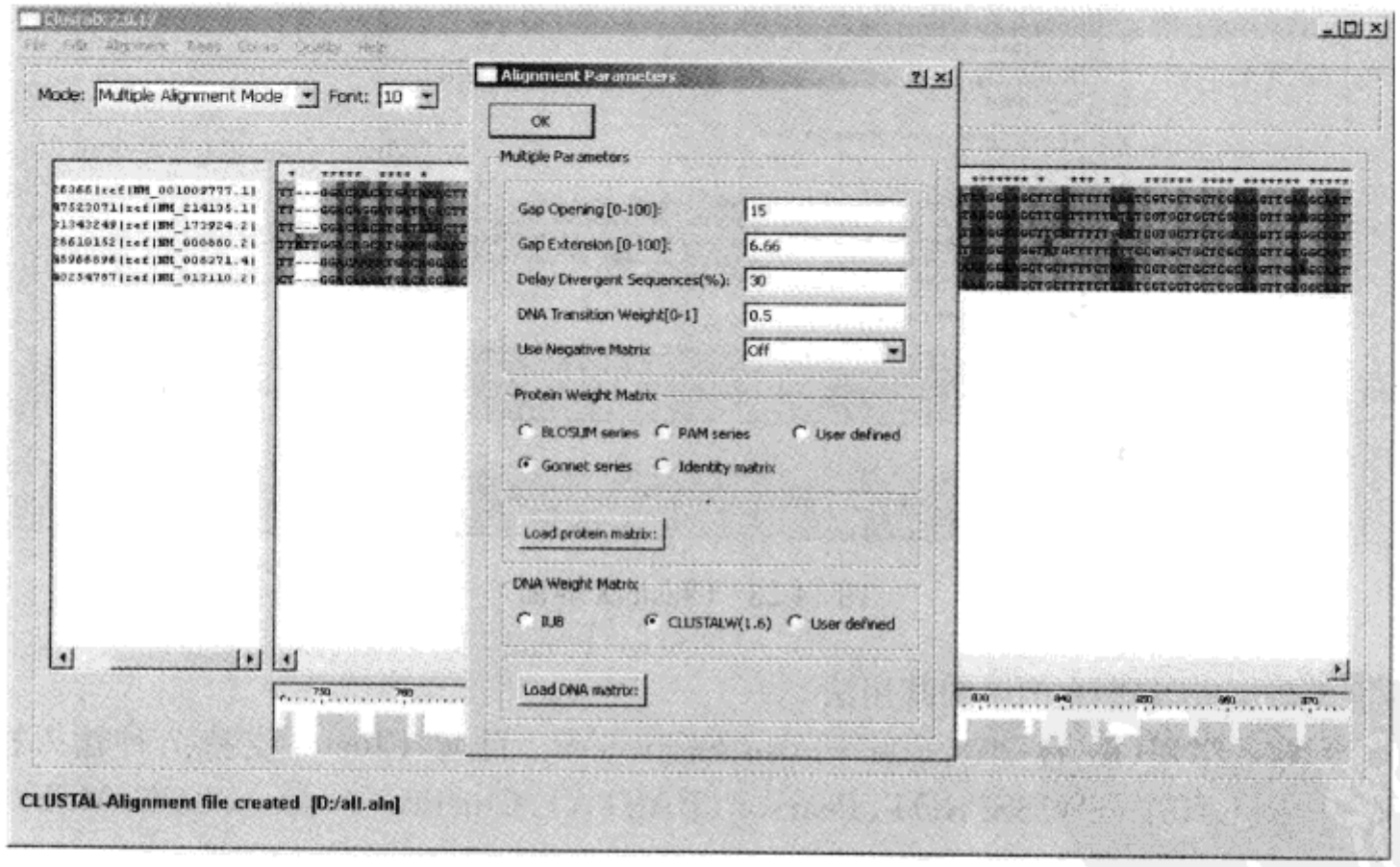


图 14-30　ClustalX 使用界面 2

观察联配结果，根据需要执行 Alignment→Realign Selected Sequences 或者 Alignment→Realign Selected Residue Range 对结果进行调整。

(3) 构建系统发育树(图 14-31)。

选择聚类方法，Tree→Clustering Algorithm，UPGMA 或者 NJ。Tree→Draw Tree。

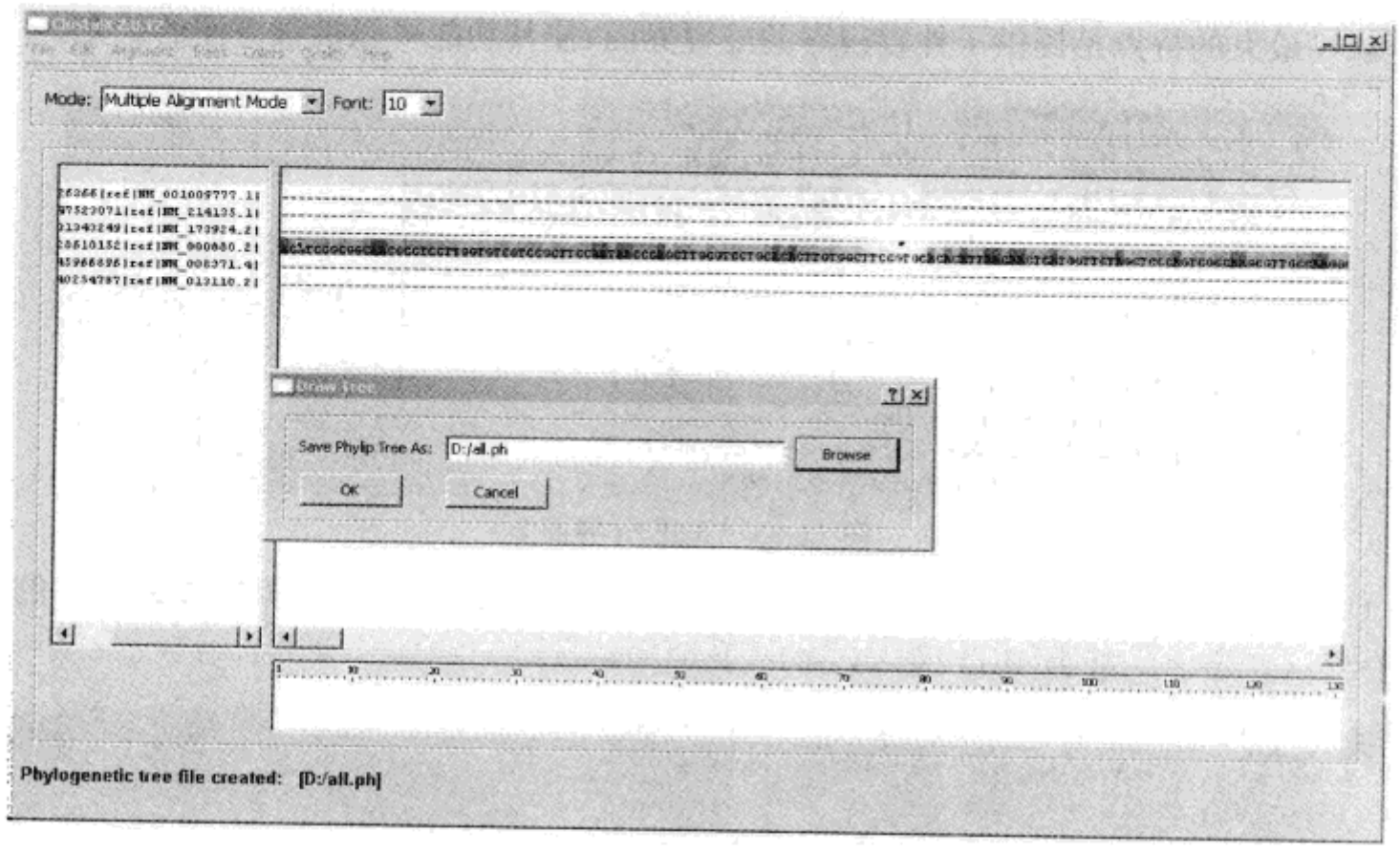


图 14-31　ClustalX 使用界面 3

9　BioEdit

BioEdit 是一个 windows 下具有图形化用户界面的序列编辑器（http://www. mbio. ncsu. edu/BioEdit/bioedit. html）。软件最初于 1997 年由 Tom Hall 开发，可以免费下载，目前已经不再维护。由于其开发的主要目的是为那些不愿意被迫详细了解一个程序的使用方法的生物学家提供一个有用的工具，因此界面非常友好（图 14-32，图 14-33）。

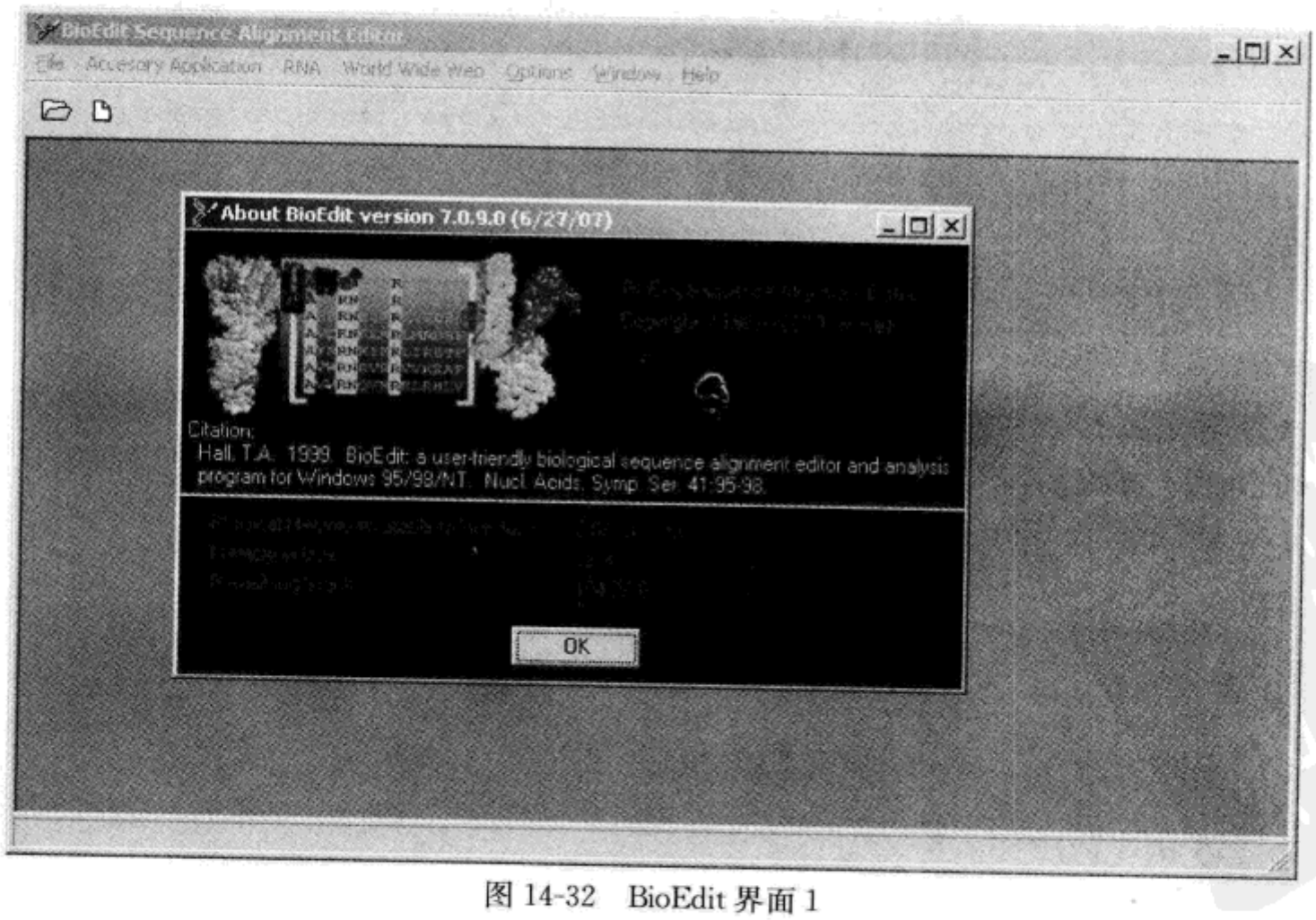


图 14-32　BioEdit 界面 1

软件最大的特点是提供了外置程序的配置界面，使其功能可以被很方便的扩充。

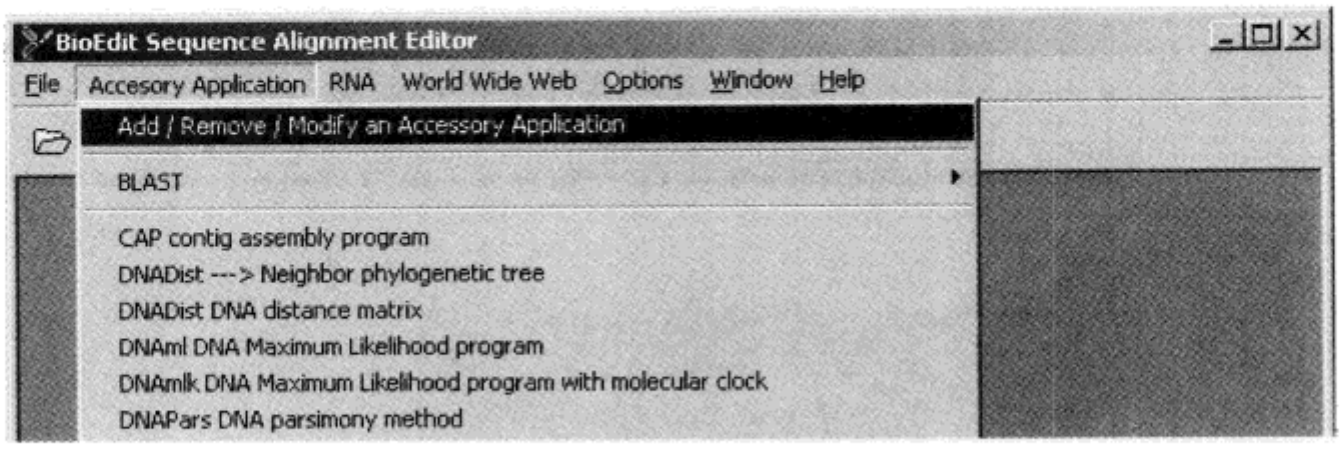


图 14-33　BioEdit 界面 2

(1) 导入测序峰图文件(sequence chromatograms)：BioEdit 支持读取 ABI 格式的测序峰图文件(扩展名一般为 ab1)(图 14-34)。File→open。

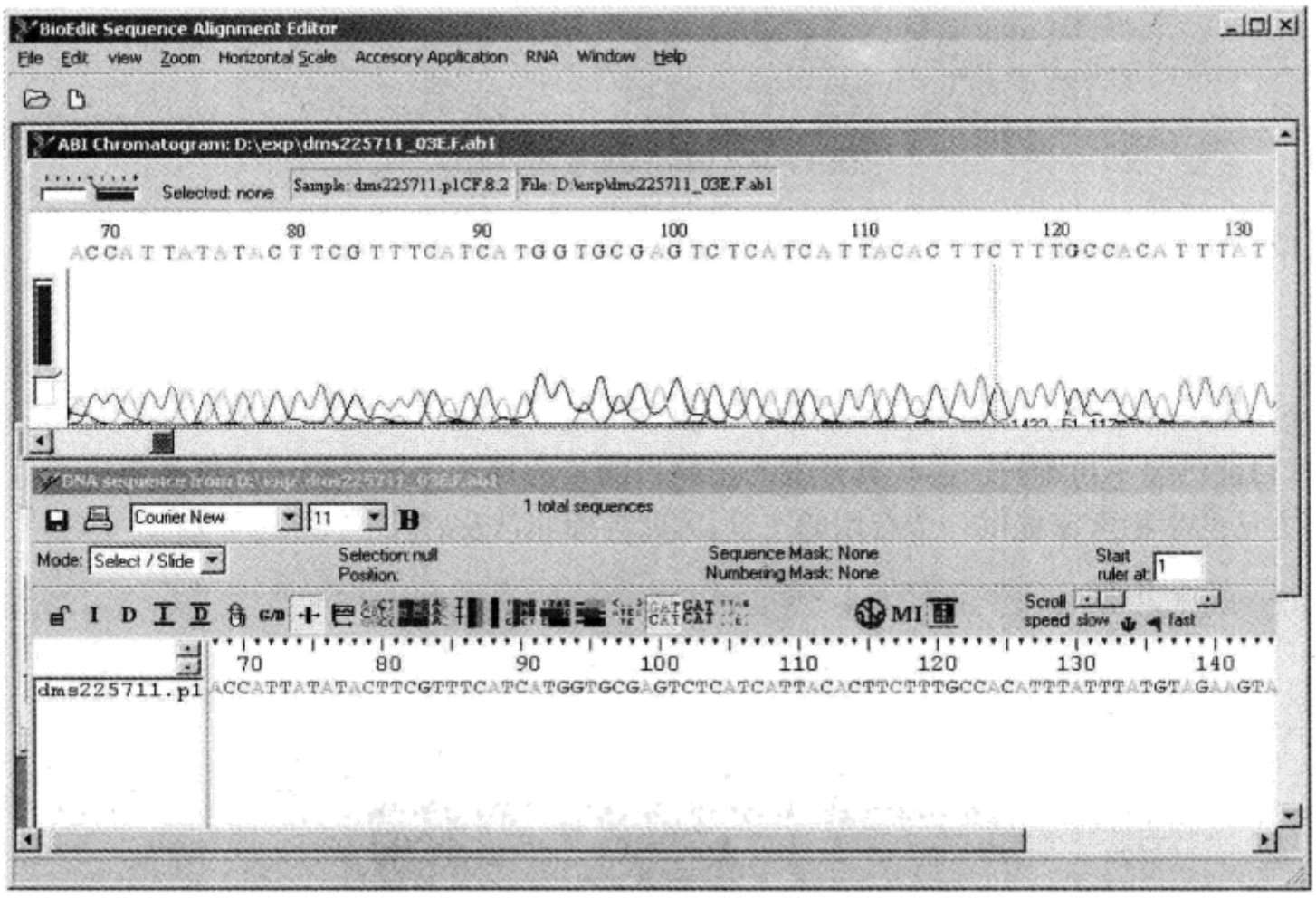


图 14-34　BioEdit 界面 3

(2) 导出成 fasta 文件：File→Export as Fasta。一般情况下，软件读取的序列并不需要特殊的处理。如确信需要进行编辑操作，可以选择序列窗口上的 Mode，将当前模式改为 Grub & Drag 或者 Edit，改完后保存即可(图 14-35)。

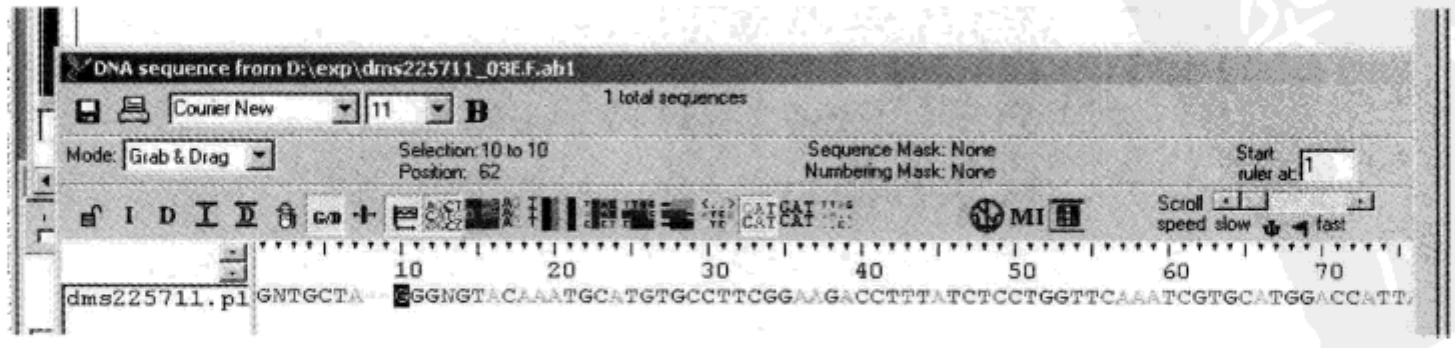


图 14-35　BioEdit 界面 4

(3) 屏蔽载体等可能的污染序列：使用本次实验中实际使用到的 vector/linker 序列进行识别或者直接使用 NCBI 的 UniVec 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html)。

(4) 序列组装：BioEdit 的序列组装功能是通过调用 cap 来实现的。其内置版本为 cap2，由 Iowa State University 的 Xiaoqiu Huang 开发。

假设对一条 cDNA 序列分别进行 5′和 3′测序，得到 2 个 reads(forward 和 reverse)；在序列编辑窗口选中这两条序列，Accessory Application→CAP contig assembly program；组装完毕后会跳出 CAP contig assembly program Output 窗口，Contig-0 即为组装好的序列；Save as fasta。

同样可根据需要对结果进行编辑(图 14-36)。

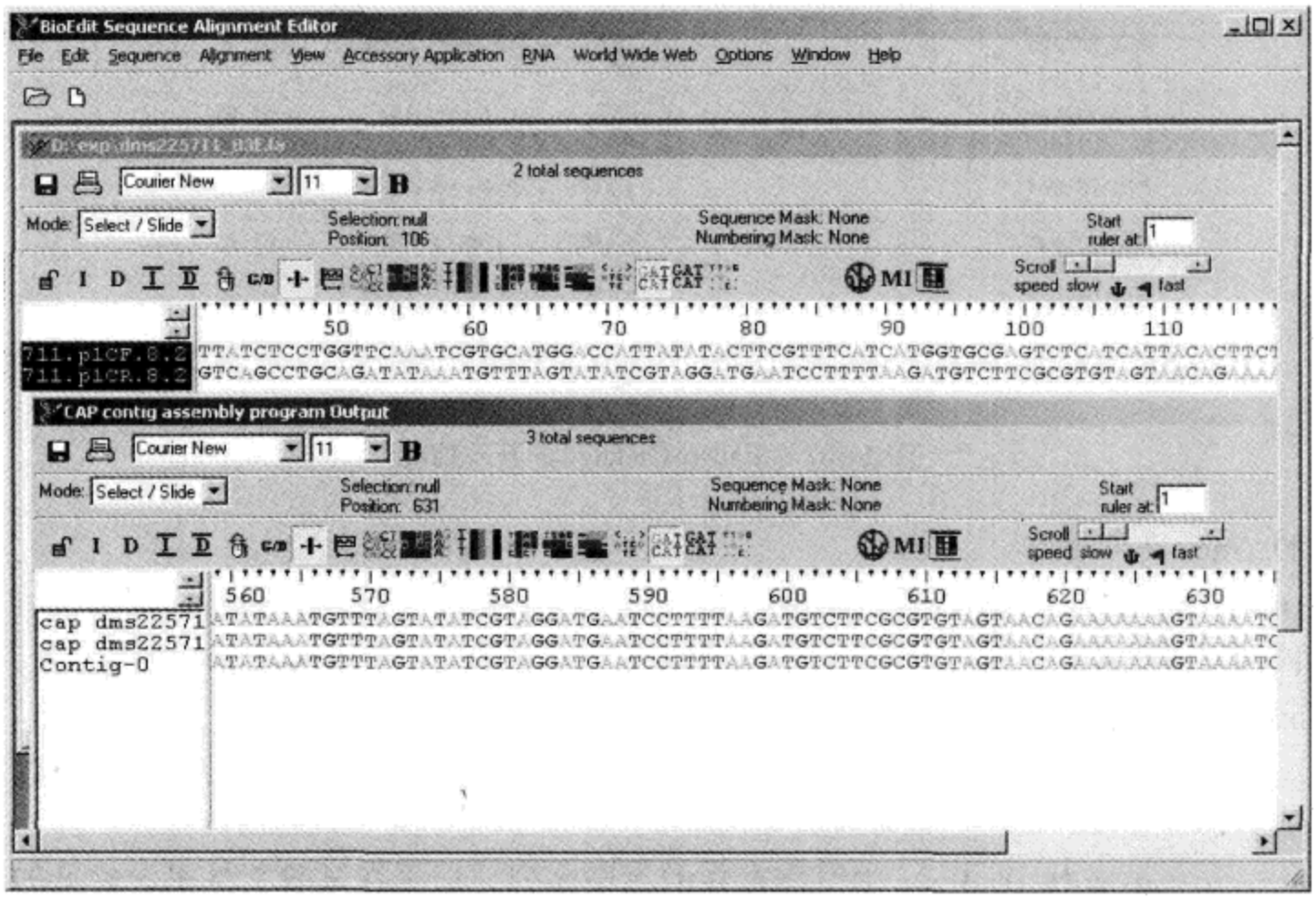


图 14-36　BioEdit 界面 5

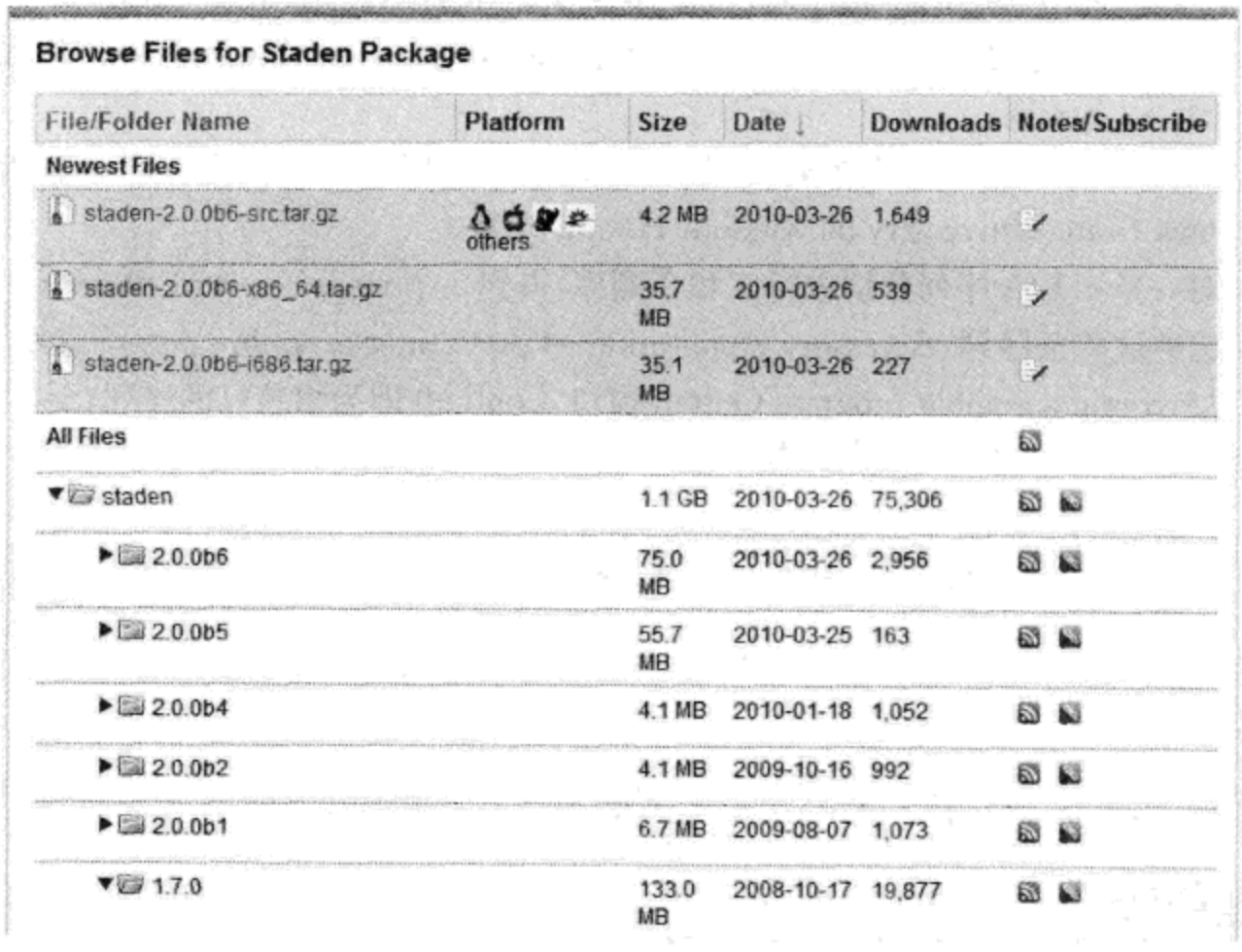
10　Staden Package

Staden Package 是一个综合性的序列分析软件包(http://staden.sourceforge.net/)。相对于其他序列处理软件来说，它自带比较完整的图形界面，功能比较完善，且提供 Windows 下的可执行程序，更适合在中小规模的测序项目和实验室环境中使用。目前其最新版本为 2.0.0b6。比较遗憾的是，从版本 2.0 开始，不再提供 Windows 下的可执行程序，其源码也只提供了 Linux/Macintosh/FreeBSD/Solaris 下的兼容性(图 14-37)。Windows 下的最新版本为 1.7.0。

(1) Staden Package 主要包括以下几个组件：

1) 组装前 Trace 文件的处理

pregap4：提供序列组装或分析所需的 trace 文件处理的图形化设置界面；提供自动完成该过程的手段。该处理过程包括 trace 文件格式转换、质量分析、载体去除、污染序列筛选、重复序列搜索。



Browse Files for Staden Package

File/Folder Name	Platform	Size	Date ↓	Downloads	Notes/Subscribe
Newest Files					
staden-2.0.0b6-src.tar.gz	others	4.2 MB	2010-03-26	1,649	
staden-2.0.0b6-x86_64.tar.gz		35.7 MB	2010-03-26	539	
staden-2.0.0b6-i686.tar.gz		35.1 MB	2010-03-26	227	
All Files					
staden		1.1 GB	2010-03-26	75,306	
2.0.0b6		75.0 MB	2010-03-26	2,956	
2.0.0b5		55.7 MB	2010-03-25	163	
2.0.0b4		4.1 MB	2010-01-18	1,052	
2.0.0b2		4.1 MB	2009-10-16	992	
2.0.0b1		6.7 MB	2009-08-07	1,073	
1.7.0		133.0 MB	2008-10-17	19,877	

图 14-37 Staden Package 的开发情况

2）trace 文件查看

trev：提供快速灵活的查看和编辑 ABI、ALF、SCF 等 trace 文件的手段。同时提供与实验文件的互操作支持。

3）序列筛选

vector_clip：查找并标记 readings 中的载体片断并记录在实验文件里。一般通过 pregap4 调用。

screen_seq：查找 readings 中可能存在的污染序列并记录在试验文件里。常见的为大肠杆菌或酵母序列污染。通常通过 pregap4 调用。

find_renz：查找并标记 readings 中的已知重复序列（如 ALUs）并记录在试验文件里。通常通过 pregap4 调用。

4）序列组装程序

gap4：提供序列组装、contig 连接、组装检查、实验建议、成对 reads 分析和 contig 编辑。提供 contigs、模板、readings 和 traces 的图形化查看界面，计算一致性序列的可信程度，查找需要人工 trace 检查和补充测序的区段。

（2）Staden Package 使用的一般步骤如下：

1）打开 pregap4，在“Files to Process”选项卡里点击“Add files”添加需要处理的 trace 文件。本程序支持 ABI、Pharmacia ALF 及 SCF 格式的 trace 文件（图 14-38）。

2）点击“Configure Modules”选项卡，配置相关的参数（图 14-39）。

一般情况下，如果 trace 文件名遵循“St. Louis”命名规则的话，应该把“General Configuration”中“Get entry names from trace files”选项改为“Yes”（默认为“No”）（图 14-39）。点

开“Quality Clip”选项，此处“Clip by confidence values”中“Average confidence”默认参数为15，即表示在50个碱基的平均质量值小于15的话，则把中心碱基标为“-”（图14-40）。此处可以根据需要调节。在其他序列处理软件如phrap里，通常认为一个碱基的α值小于等于0.01，即质量值要大于等于20，则认为该读取是可靠；

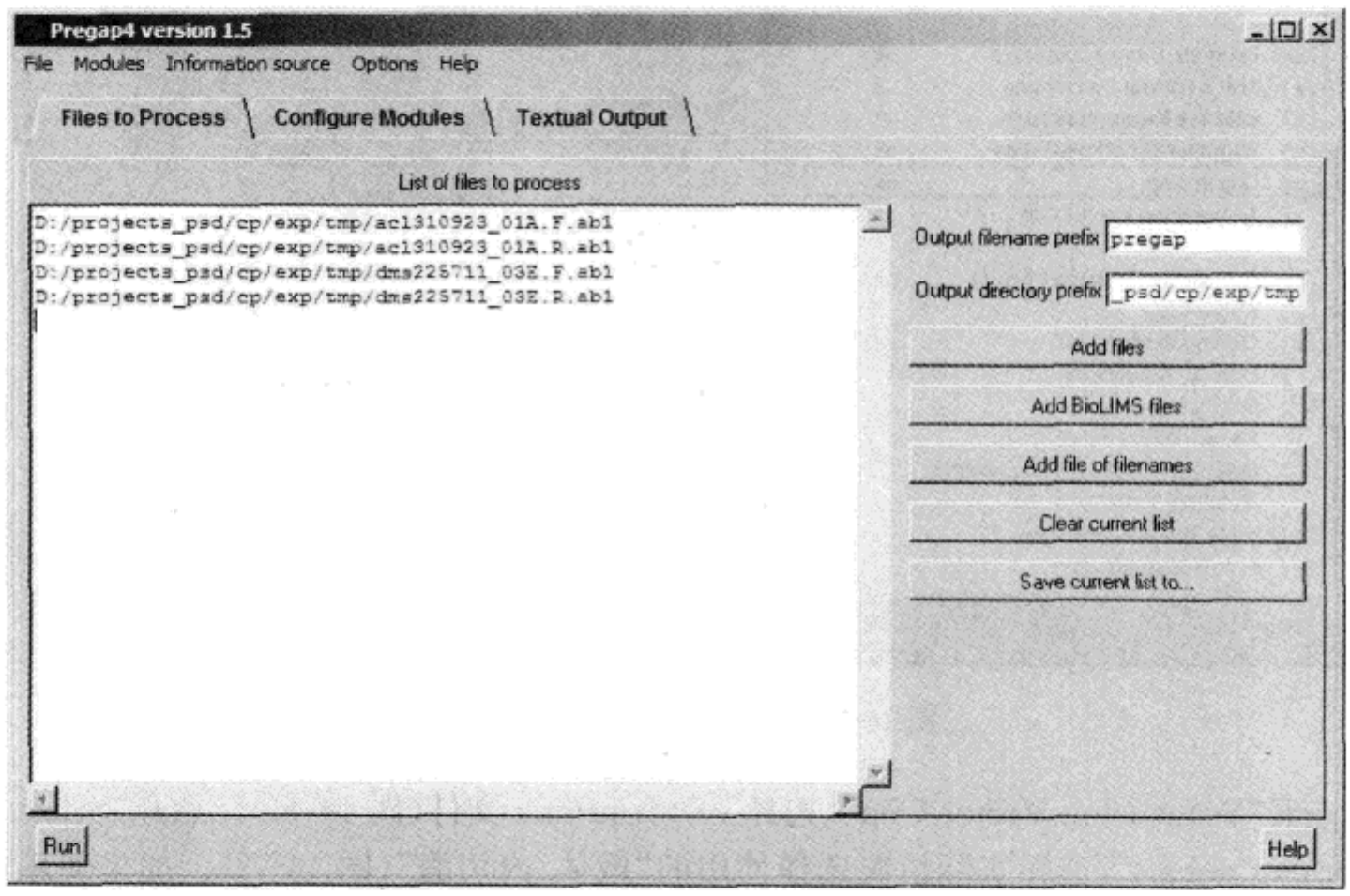


图14-38　Staden Package使用步骤1

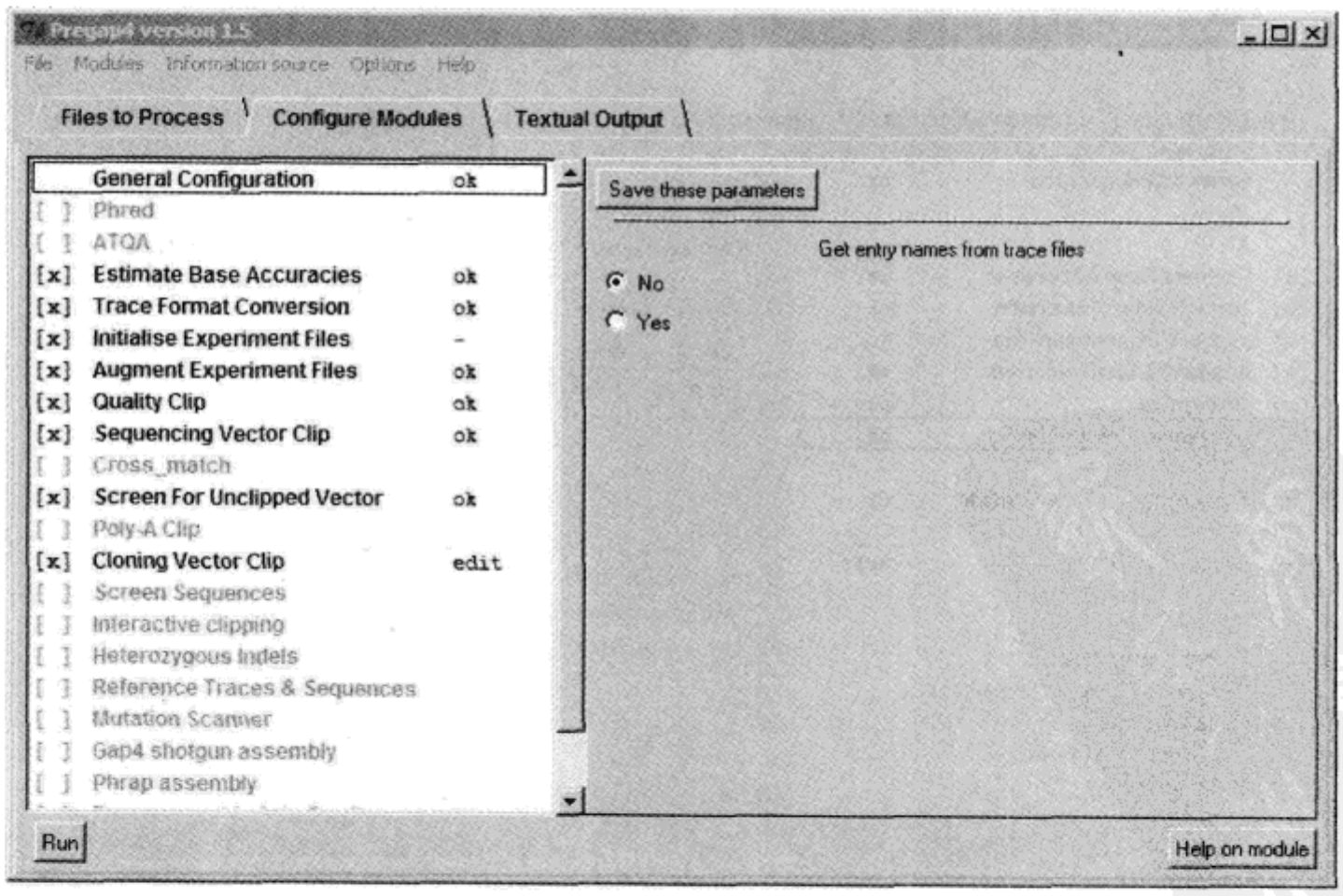


图14-39　Staden Package使用步骤2

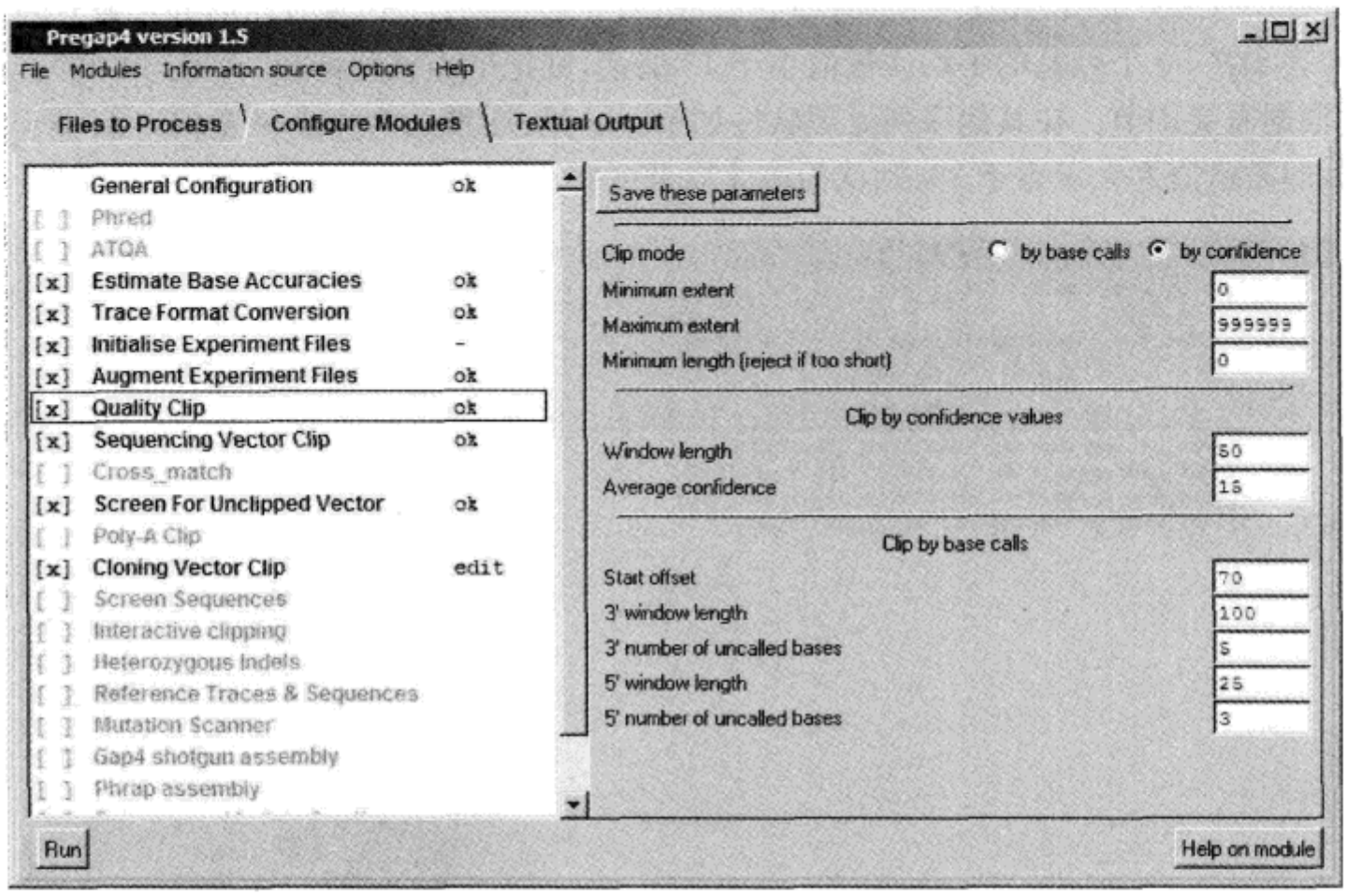


图 14-40 Staden Package 使用步骤 3

点开“Sequencing Vector Clip”,选择 vector-primer 文件(图 14-41)。点开“Select vector-primer subset”,选择实际情况选择使用的“载体/内切酶”(图 14-42)。如果使用的载体——引物恰好不在列表中,则参照 vector_primer 文件自建合适的文件(图 14-43);

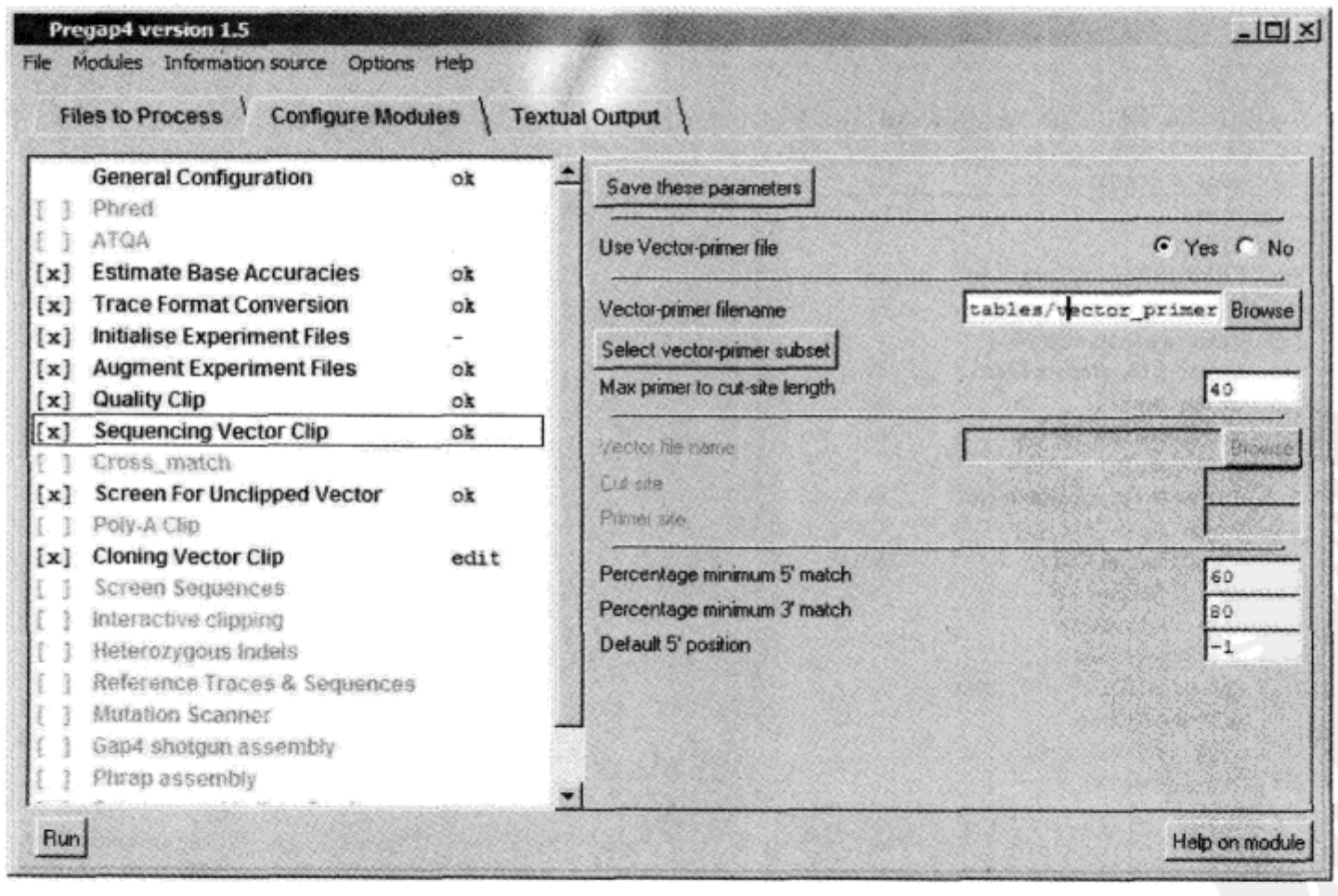


图 14-41 Staden Package 使用步骤 4

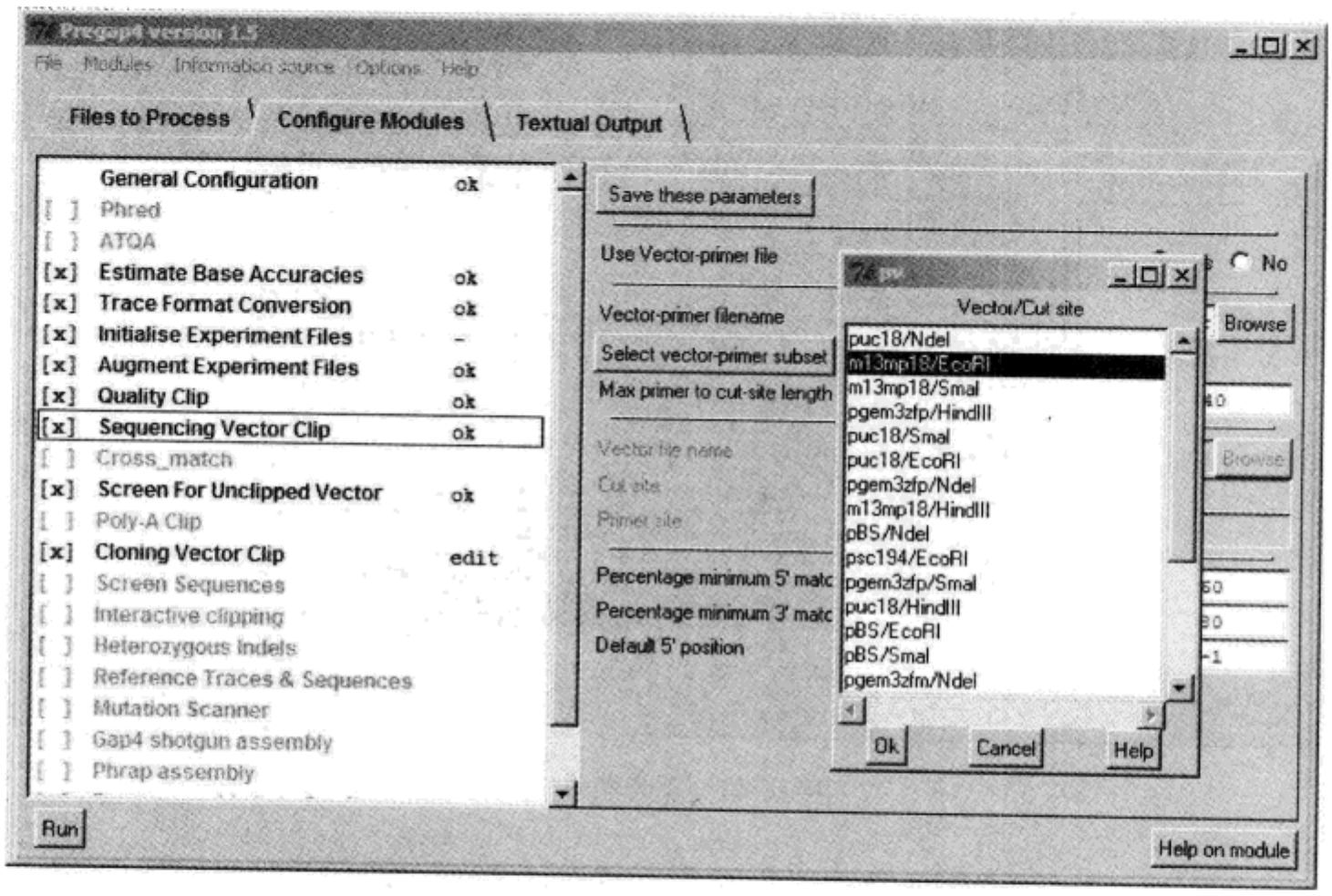


图 14-42　Staden Package 使用步骤 5

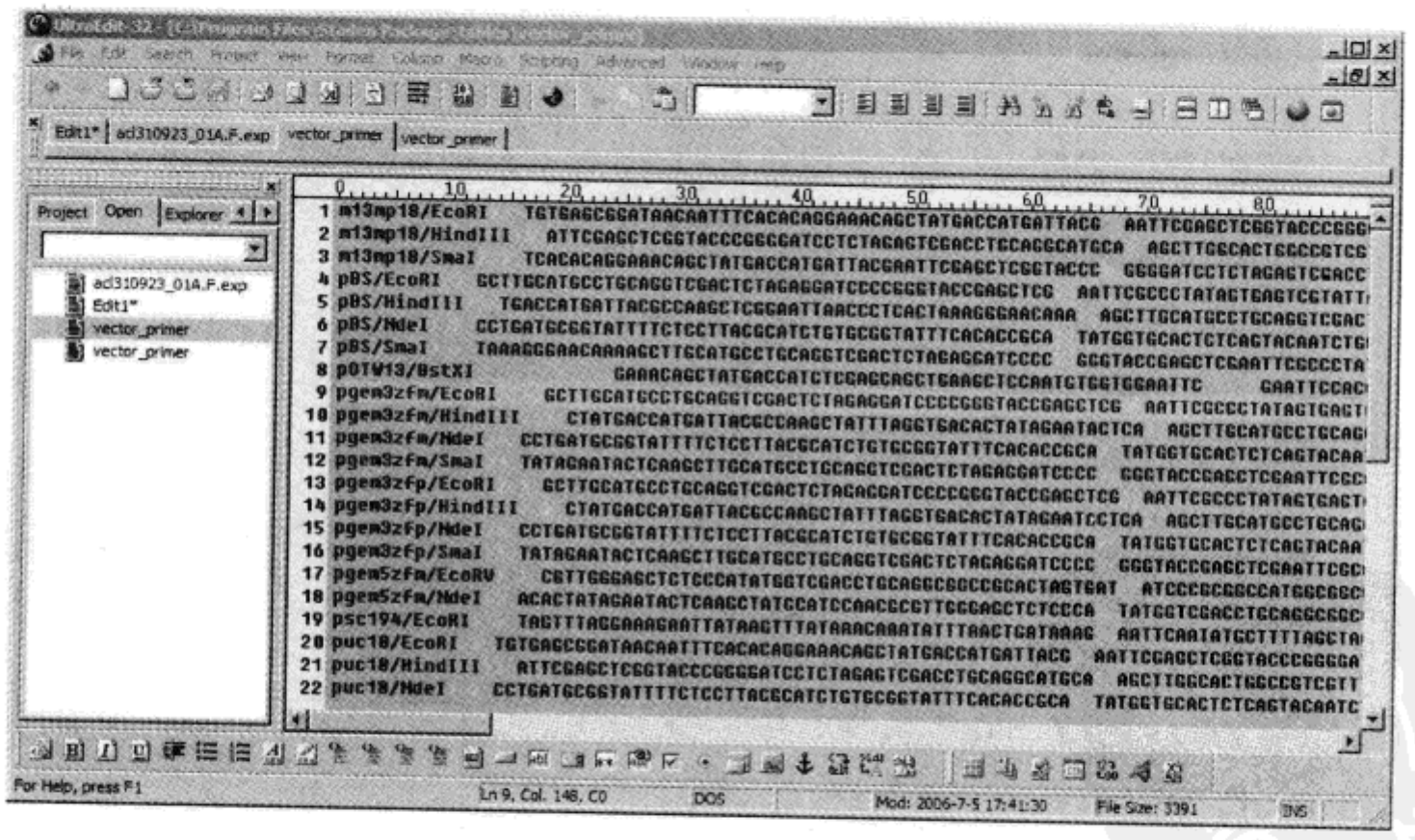


图 14-43　vector_primer 文件格式

创建克隆载体文件，此文件需要自己建立，文件格式为去掉“>”行的 FASTA 格式(图 14-44)。点开“Cloning Vector Clip”，选择创建的克隆载体序列文件(图 14-45)。

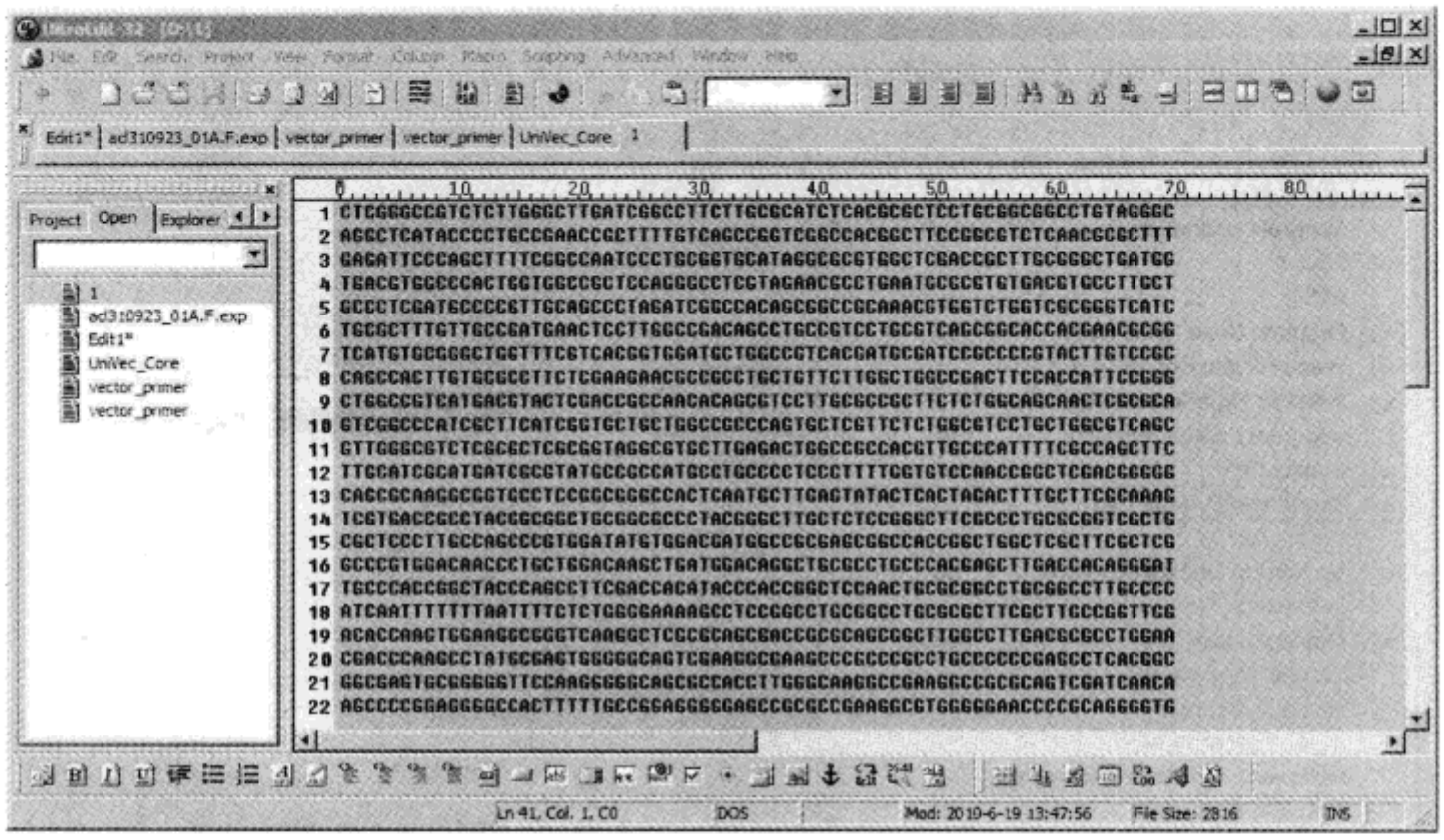


图 14-44　克隆载体文件

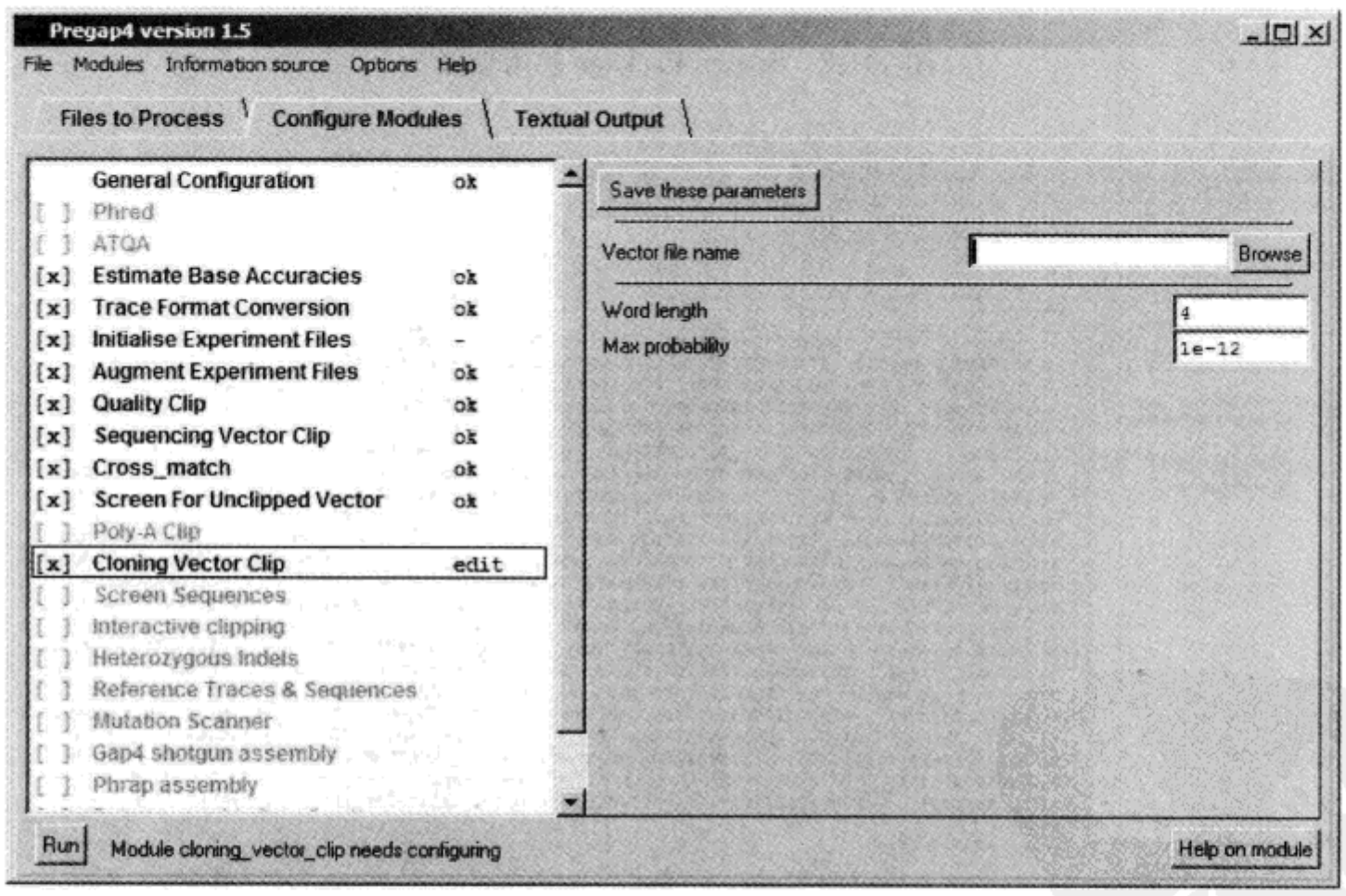


图 14-45　Staden Package 使用步骤 6

选中“Gap4 shotgun assembly”，在右面选项卡的“Gap4 database name”中输入新创建的数据库文件名(图 14-46)。

3) 点击左下角的“Run”，执行 pregap4。查看处理过程信息，如下方的“Error window”有出错信息，则根据提示修改相应参数后再执行(图 14-47)。

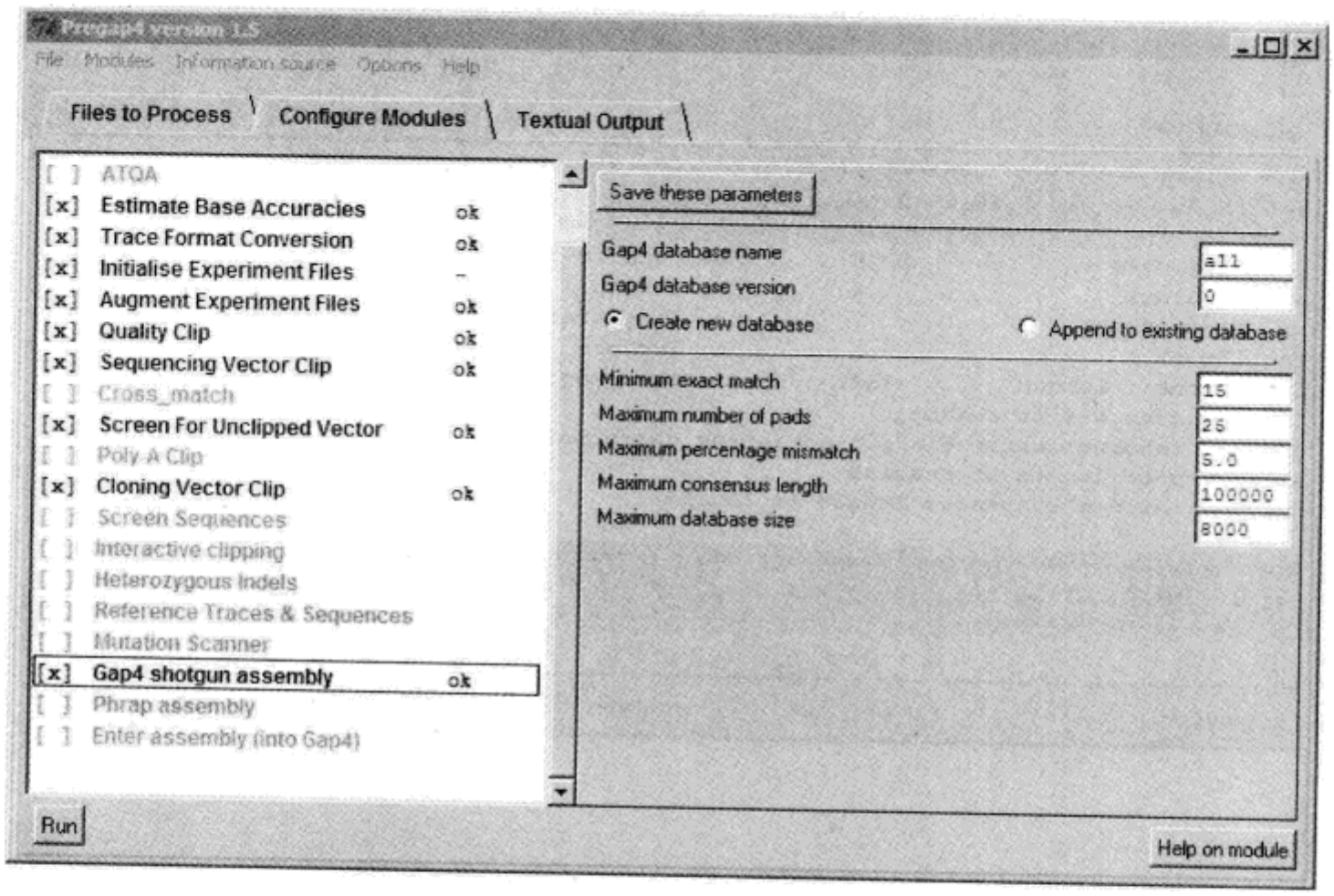


图 14-46　Staden Package 使用步骤 7

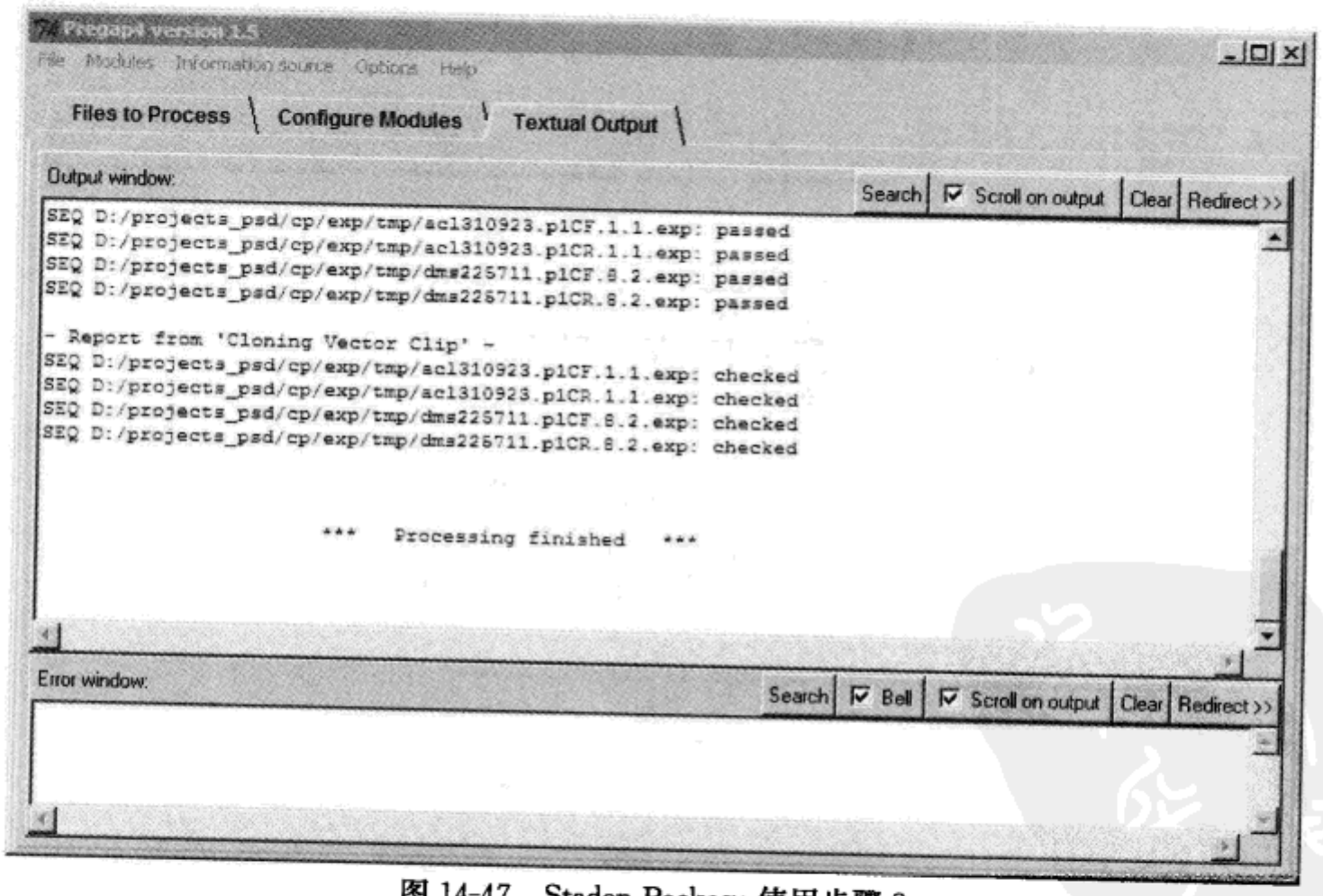


图 14-47　Staden Package 使用步骤 8

a) 打开 gap4，File→Open，选中上一步创建的数据库文件 all. 0. aux。程序自动开始组装；

b) 查看结果（图 14-48）。“Contig Selector 窗口”选择想要查看的 contig，右键菜单“Template display”或者“Edit contig”，根据需要可以手工调节 contig（图 14-49）。

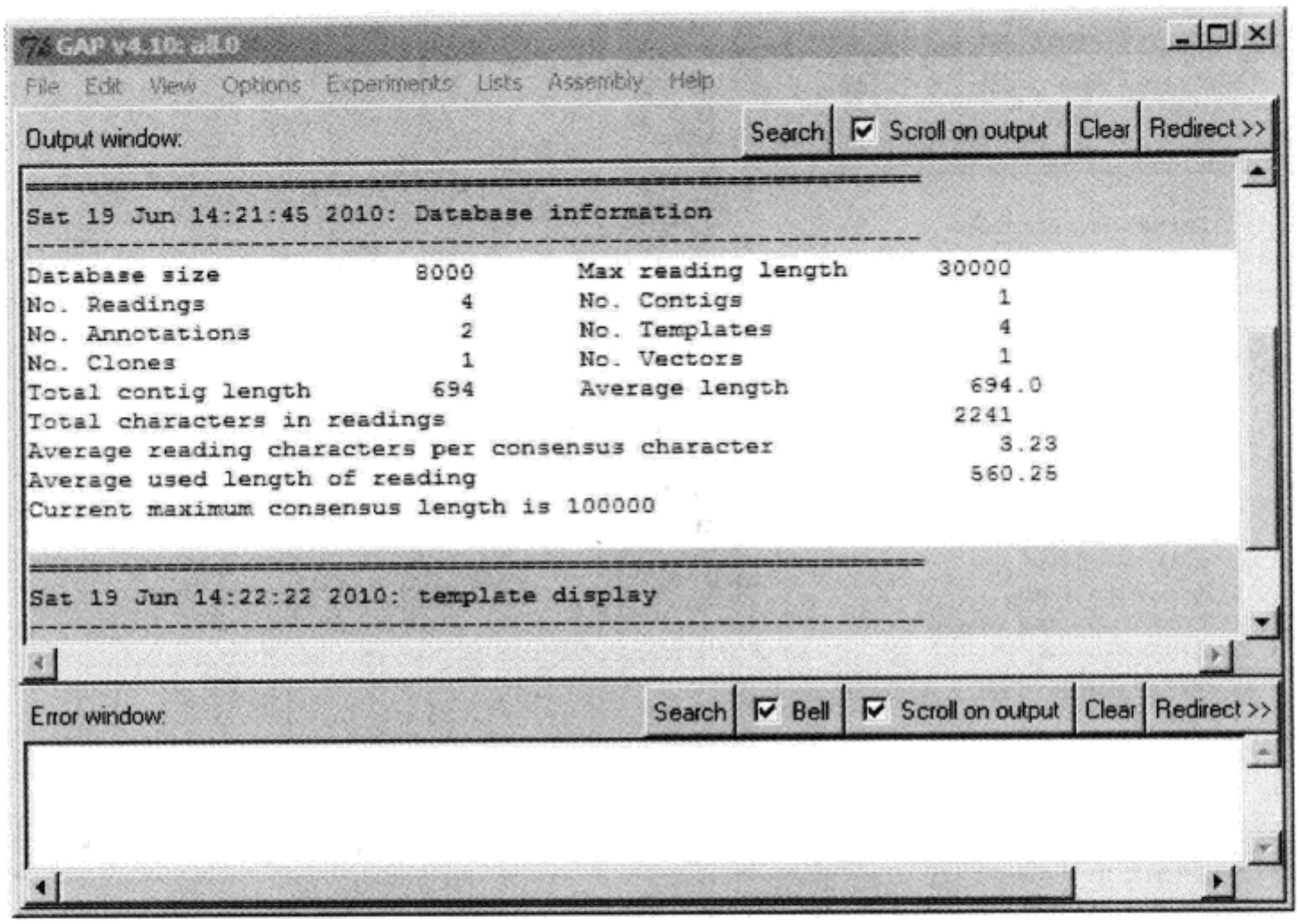


图 14-48 Staden Package 使用步骤 9

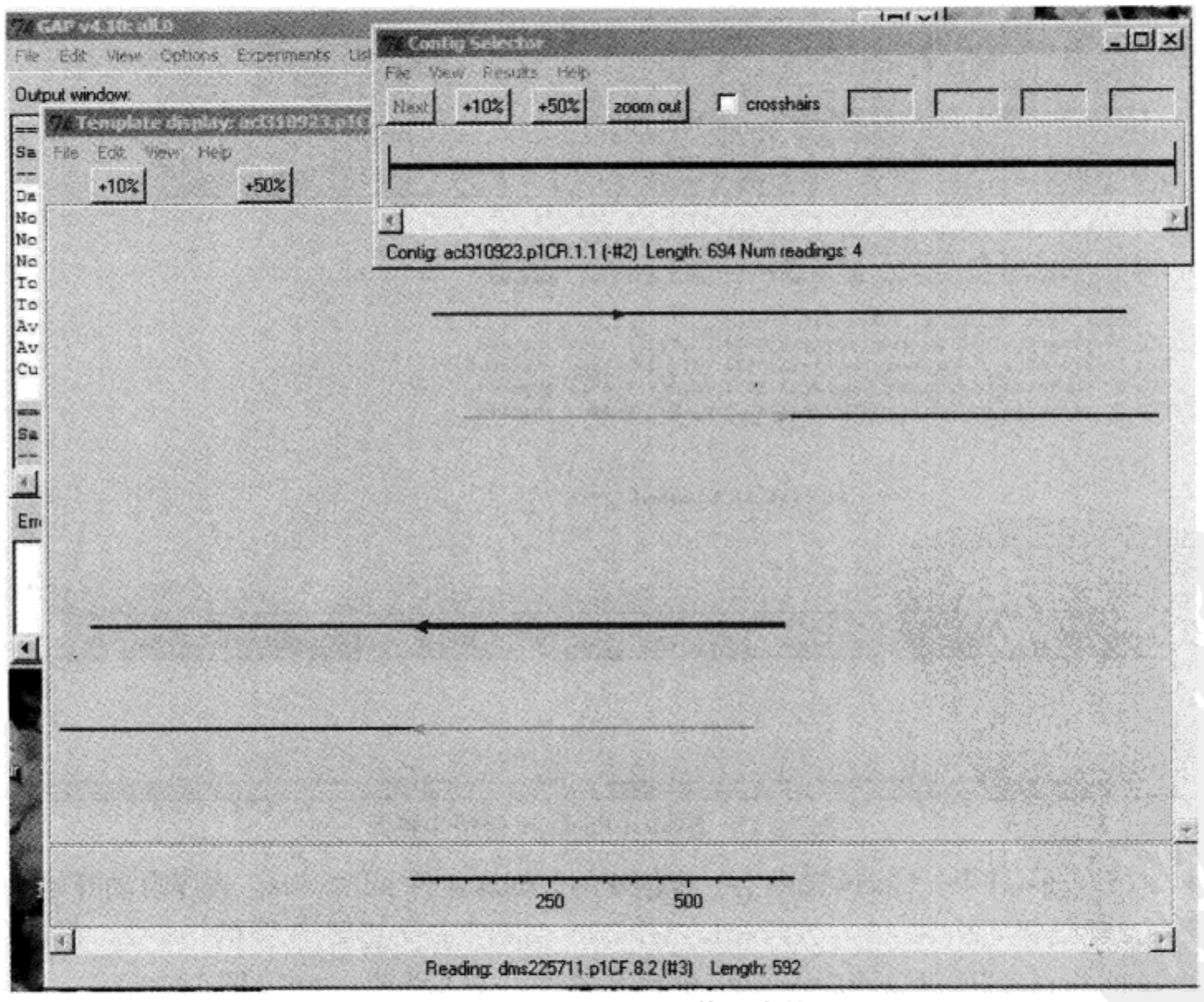


图 14-49 Staden Package 使用步骤 10

在 gap4 主窗口 View，选择相应的菜单项查看相应的情况（图 14-50）。如“Quality plot”、“SNP candidates” 等（图 14-51，图 14-52）。

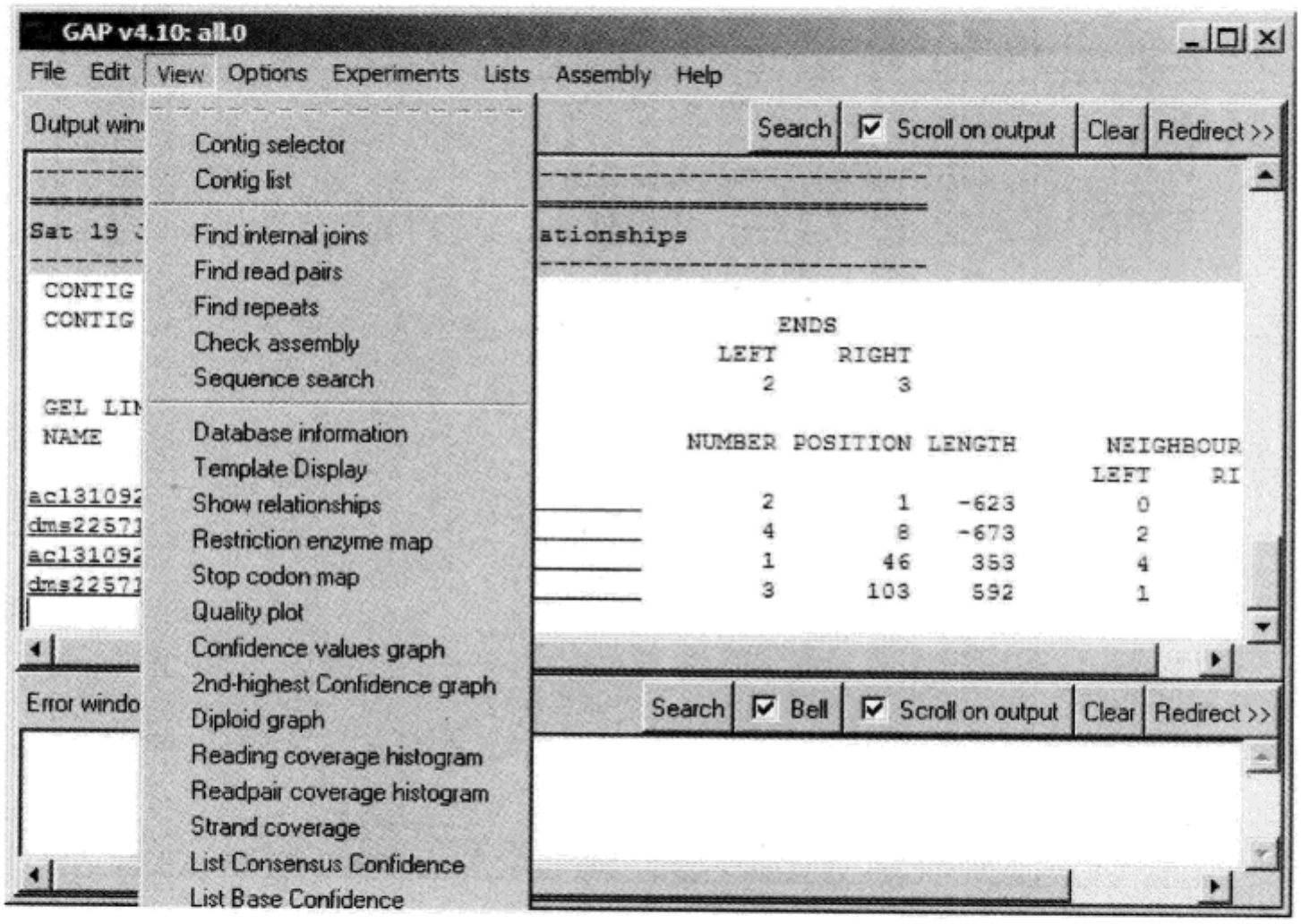


图 14-50　Staden Package 使用步骤 11

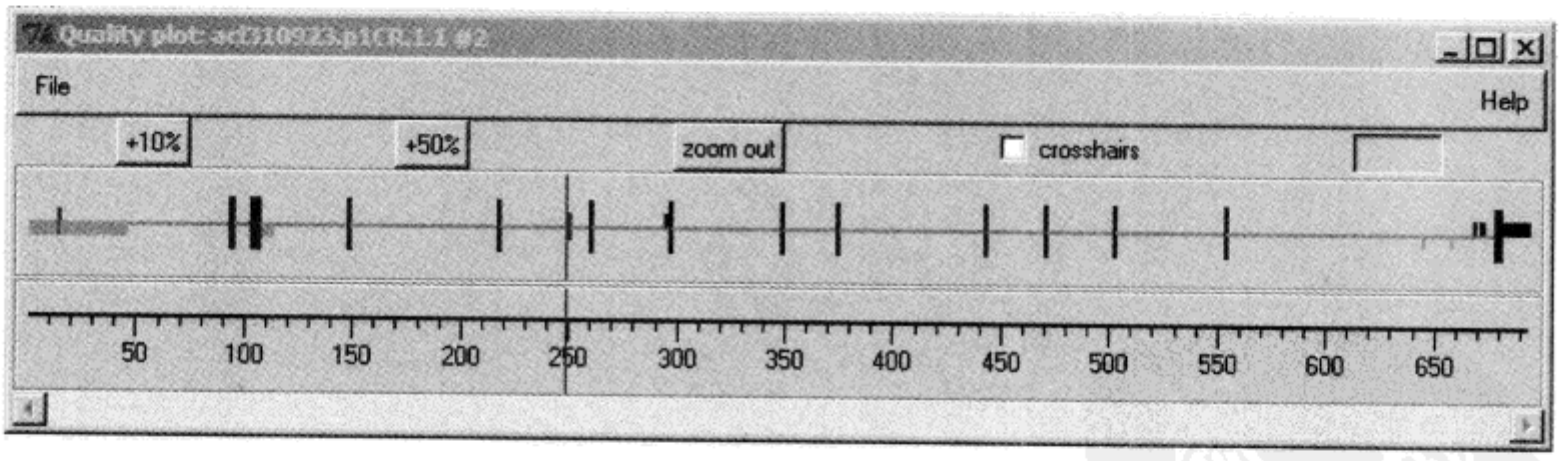


图 14-51　对 contig 进行 quality plot

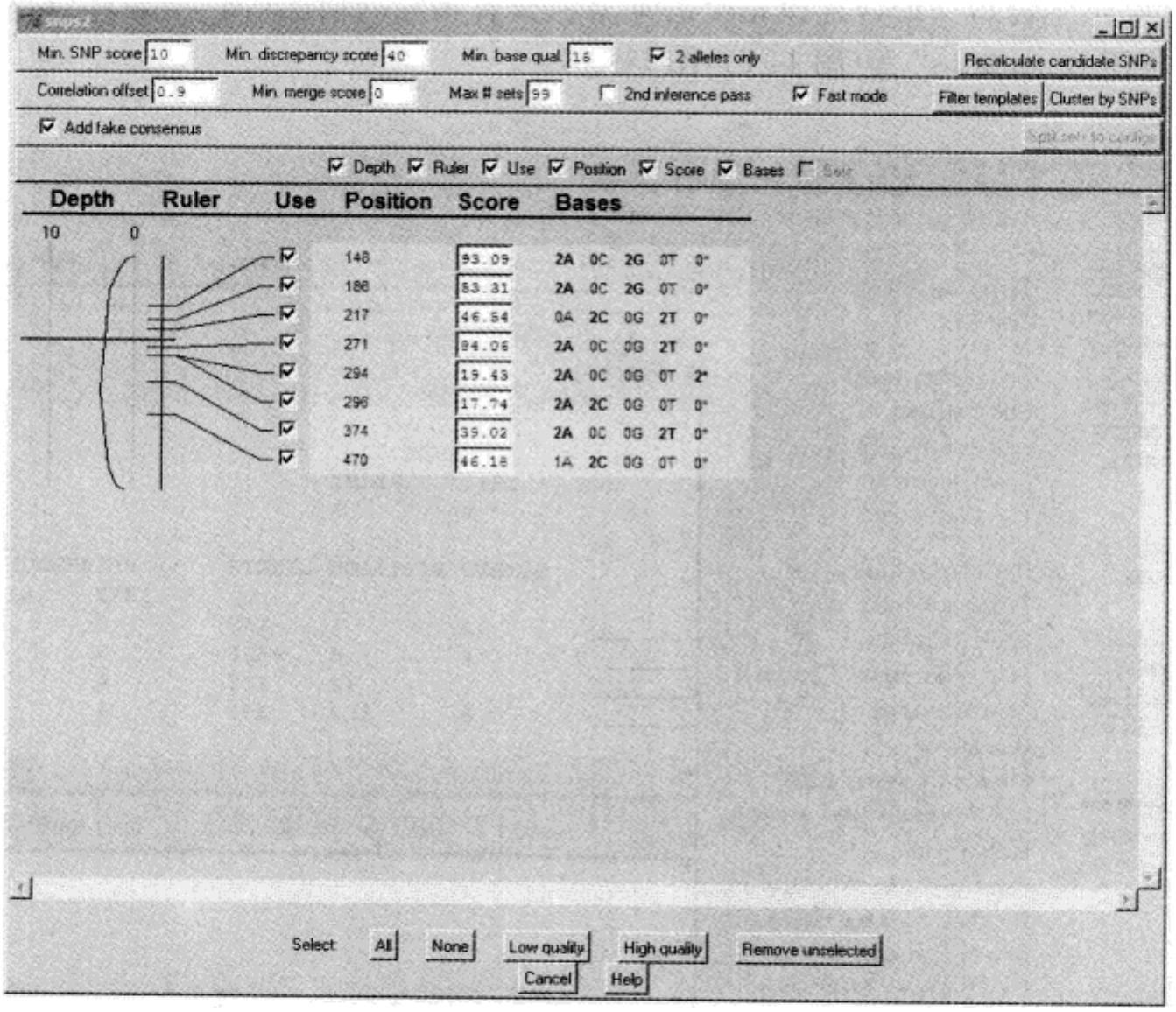


图 14-52 查看 SNP 情况

参 考 文 献

樊荣辉，武治印，王永强等．2010. RNAi 技术及在真菌基因功能研究中的应用．菌物学报，29(3)：315—320.

Aguilera A, Gómeza F, Lospitaob E, A et al. 2006. A molecular approach to the characterization of the eukaryotic communities of an extreme acidic environment: Methods for DNA extraction and denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Systematic and Applied Microbiology, 29:593—605.

Anderson I C, Cairney J W G. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. Environmental Microbiology, 6(8): 769—779.

Aravin A, Tuschl T. 2005. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. FEBS Letters, 579:5830—5840.

Bo Dong, Xiao-Hong Liu, Jian-Ping Lu, et al. MgAtg9 trafficking in *Magnaporthe oryzae*. Autophagy, 2009, 5(7): 1—8.

Bos CJ. 1996. Fungal genetics, principle and practice. Marcel dekker, New York: CRC Press.

Bromley M, Gordon C, Rovira-Graells N, et al. 2006. The Aspergillus fumigatus cellobiohydrolase B (cbhB) promoter is tightly regulated and can be exploited for controlled protein expression and RNAi. FEMS Microbiol Lett, 264:246—254.

Caracuel-Rios Z, Talbot N J. 2008. Silencing the crowd: high-throughput functional genomics in *Magnaporthe oryzae*. Molecular Microbiology, 68(6): 1341—1344.

Carthew R W, Sontheimer E J. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell, 136: 642—655.

Chi M H, Park S Y, Lee Y H. 2009. A Quick and Safe Method for Fungal DNA Extraction. Plant Pathol J, 25(1): 108—111.

Choudhary S, Lee HC, Maiti M, et al. 2007. A double-stranded-RNA response program important for RNA interference efficiency. Mol Cell Biol, 27:3995—4005.

Cogoni C, and Macino G. 1999. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. Nature, 399: 166—169.

Cogoni C, Irelan J T, Schumacher M, et al. 1996. Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. EMBO J, 15: 3153—3163.

Cogoni C, Macino G. 1997. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 94:10233—10238.

Collins RE, Cheng X. 2005. Structural domains in RNAi. FEBS Letters, 579:5841—5849.

Desslle R, Schierwater B. 1998. Molecular approaches to ecology and evolution. Boston: Birkhäuser.

Drinnenberg I A, Weinberg D E, Xie K T, et al. 2009. RNAi in Budding Yeast. Science, 326:544—550.

Elsas J D, Duarteb GF, Keijzer-Woltersa A, et al. 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Microbiological Methods, 43:133—151.

Filion M, St-Arnaud M, Jabaji-Hare SH. 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. Journal of Microbiological Methods, 53:67— 76.

Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature, 391:806—811.

Freitag M, Lee D W, Kothe G O, et al. 2004. DNA methylation is independent of RNA interference in Neurospora. Science, 304:1939.

Gadanho M., Sampaio J P. 2004. Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus river, Portugal. FEMS Yeast Research, 5 (3):253—261.

Gladfelter A S. 2006. Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins. Nature Reviews of Microbiology, 4 :223—229.

Griffiths G. 1993. Fine structure immuno-cytochemistry. Berlin: Springer-Verlag.

Hammond S M. 2005. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interfere. FEBS Letters, 579:5822—5829.

Harris E L V, Angal S. 1990. Protein purification methods. Oxford: IRL Press.

He L, Hannon G J. 2004. MicroRNAs: Small RNAs With a Big Role in Gene Regulation. Nature Review Genetics, 5:

522—531.

Heb J, Xua Z, Hughes J. 2005. Pre-lysis washing improves DNA extraction from a forest soil. Soil Biology & Biochemistry, 37:2337—2341.

Hunter T, Sefton BM. 1991. Methods in enzymology. London: Academic Press.

Janssen P, Coopman R, Huys G, et al. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as an new tool in bacterial taxonomy. Microbiology,142 :1881—1893

Kamono A,Fukui M. 2006. Rapid PCR-based method for detection and differentiation of Didymiaceae and Physaraceae (myxomycetes) in environmental samples. Journal of Microbiological Methods, 67:496—506.

Kay E, Wren B W. 2009. Recent advances in systems microbiology. Current Opinion in Microbiology, 12:577—581.

Kennedy S, Wang D, Ruvkun G. 2004. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in C. elegans. Nature,427, 645—649.

Kirk J L, Beaudette L A, Hart M, et al. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods, 58:169—188.

Kornitzer D. 2009. Fungal mechanisms for host iron acquisition. Current Opinion in Microbiology, 12:377—383.

Krajaejun T, Gauthier G M, Rappleye C A, et al. 2007. Development and application of a green fluorescent protein sentinel system for identification of RNA interference in *Blastomyces dermatitidis* illuminates the role of septin in morphogenesis and sporulation. Eukaryot Cell, 6: 1299—1309.

Liu H, Cottrell T R, Pierini L M, et al. 2002. RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Genetics, 160: 463—470.

Livak K J,Schmittgen T D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods, 25:402—408.

Ma Y, Creanga A, Lum L, et al. 2006. Prevalence of off-target effects in Drosophila RNA interference screens. Nature, 443:359—363.

Martinelli S D,Kinghorn J R. 1994. Aspergillus:50 years on. Amsterdam: Elsevier.

Meister G. , Tuschl T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature, 431:343—349.

Moazed D. 2009. Rejoice-RNAi for Yeast. Science, 326(23):533—534.

Nakayashiki H, 2005. RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications. FEBS Letters, 579: 5950—5957.

Nakayashiki H, Hanada S, Quoc N B, Kadotani N, Tosa Y, Mayama S. 2005. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. Fungal Genetics and Biology, 42: 275—283.

Nakayashiki H, Nguyen Q B. 2008. RNA interference: roles in fungal biology. Current Opinion in Microbiology, 11: 494—502.

Oros-Sichler M, Gomes N C M, Neuber G, et al. 2006. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. Journal of Microbiological Methods, 65: 63—75.

Shafran H, Miyara I, Eshed R, et al. 2008. Development of new tools for studying gene function in fungi based on the Gateway system. Fungal Genet Biol, 45:1147—1154.

Sharma C M, Vogel J. 2009. Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. Current Opinion in Microbiology, 12:536—546.

Shiu P K T, Raju N B, Zickler D, et al. 2001. Meiotic silencing by unpaired DNA. Cell, 107:905—916.

Sung G H, Sung J M, Hywel-Jones N L, et al. 2007. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. Molecular Phylogenetics and Evolution, 44: 1204—1223.

Talbot N. 2001. Molecular and Cellular Biologyof Filamentous Fungi. Oxford: Oxford University Press.

Tong-Bao Liu, Guo-Qing Chen, Hang Min, et al. 2009. MoFLP1, encoding a novel fungal fasciclin-like protein, is involved in conidiation and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. J Zhejiang Univ SCI B, 10(6): 434—444.

Verdel1A. , Moazed D. 2005. RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast. FEBS Letters, 579:5872—5878.

Weising K, Nyboom H, Wolff K, et al. 1995. DNA fingerprinting in plant and fungi. Boca Raton: CRC Press.

Weld R, Plummer K M, Carpenter M A, et al. 2006. Approaches to functional genomics in flamentous fungi. Cell Research,16: 31—44.

Yua J H, Hamari Z, Hana K H, et al. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. Fungal Genetics and Biology, 41:973—981.

Zaratiegui M, Irvine D V, Martienssen R A. 2007. Noncoding RNAs and Gene Silencing. Cell, 128:763—776.

[General Information]
书名=农产品中真菌毒素的检测分析
作者=张艺兵，鲍蕾，褚庆华主编
页数=279
SS号=11591358
出版日期=2006.02
出版社=2006.02